

**MICHELE SALMON FREHSE**

**VIGILÂNCIA ATIVA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE  
SÃO JOSÉ DOS PINHAIS - PR**

**CURITIBA  
2008**

**MICHELE SALMON FREHSE**

**VIGILÂNCIA ATIVA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE  
SÃO JOSÉ DOS PINHAIS - PR**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Área de Concentração: Patologia Veterinária, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Marcelo Beltrão Molento

**CURITIBA**

**2008**

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “**VIGILÂNCIA ATIVA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS - PR**” apresentada pela Mestranda **MICHELE SALMON FREHSE**, declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03–CEPE/UFPR, que considerou a candidata APTA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Patologia Veterinária.

Curitiba, 31 de março de 2008.

Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento  
Presidente/Orientador

Prof. Dr. Alexander Biondo  
Membro

Prof. Dr. Hélio Langoni  
Membro

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela saúde e disposição para realização desta etapa em minha vida.

A minha família pelo incentivo, amizade e confiança em todas as etapas da minha vida.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento pelos ensinamentos, pela paciência, amizade e confiança.

Ao Prof. Dr. Alexander Welker Biondo pelos ensinamentos, conselhos e pela amizade.

A Técnica do Laboratório de Doenças Parasitárias, Sra. Maria Rosa Câmara pelos ensinamentos, ajuda, amizade e confiança.

A Secretária da Pós-Graduação, Maria José Botelho Maeda pela forma exemplar que sempre me atendeu e pela amizade.

A Prof<sup>a</sup>. Neide Mariko Tanaka pela importante ajuda na realização desta dissertação, pelo incentivo, ensinamentos e pela amizade.

A amiga Cristina Sakamoto pela grande ajuda no processamento das amostras, pelas tardes de estudo, conselhos e pela amizade.

Ao Centro de Controle de Zoonoses do Município de São José dos Pinhais pela forma maravilhosa que me recebeu, ao Cláudio Feitosa pela abertura para a realização de meu projeto.

Em especial ao Médico Veterinário do Centro de Controle de Zoonoses do Município de São José dos Pinhais, José Edivaldo Bonacim, às funcionárias e amigas Margareth Pereira Raizer e Andressa Trevisan que tanto me ajudaram nas colheitas de uma forma agradável e com muito bom humor.

Ao Prof. Dr. Hélio Langoni por ter me proporcionado estágio no Laboratório de Zoonoses na UNESP – Botucatu onde aprendi a rotina de um laboratório modelo e pude processar todas as amostras de soro pela RIFI e do teste ELISA.

A Doutoranda, Juliana G. Machado, pela forma maravilhosa que me recebeu e ensinou a fazer o Ensaio Imunoenzimático, pela amizade e boa vontade.

Aos Médicos Veterinários Residentes do Laboratório de Zoonoses – UNESP Botucatu - Haroldo Greca Júnior, Lucilene Granuzzio Camossi e Leila Sabrina Ullmann pelos ensinamentos e ajuda para processar as RIFI.

As Mestrandas Janaína Biotto Camargo e Marcela Zampoli Troncarelli pela ajuda e dicas para melhor desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Jair Mendes Marques da Universidade Tuiuti do Paraná pelo auxílio na Análise Estatística.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>13</b>
1.1.1 CLASSIFICAÇÃO ZOOLOGICA.....	13
1.1.2 CICLO BIOLÓGICO.....	14
<b>1.1.3 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA.....</b>	<b>15</b>
1.1.4 PREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE.....	17
<b>1.1.5 FISIOPATOLOGIA.....</b>	<b>19</b>
1.1.5.1 VIAS DE INFECÇÃO E PATOGENIA.....	19
1.1.5.2 ALTERAÇÕES CUTÂNEAS.....	20
1.1.5.3 ALTERAÇÕES ESPLÊNICAS E HEPÁTICAS.....	21
1.1.5.4 ALTERAÇÕES NO TECIDO HEMATOPOIÉTICO .....	22
1.1.5.5 ALTERAÇÕES NOS LINFONODOS .....	22
1.1.5.6 ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS.....	22
<b>1.1.6 ACHADOS CLÍNICOS.....</b>	<b>25</b>
<b>1.1.7 DIAGNÓSTICO.....</b>	<b>27</b>
<b>1.1.8 TESTES SOROLÓGICOS .....</b>	<b>30</b>
<b>1.1.9 IDENTIFICAÇÃO DO PARASITA PELA MICROSCOPIA E CULTURA....</b>	<b>30</b>
<b>1.1.10 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE e (PCR).....</b>	<b>31</b>
<b>1.1.11 TRATAMENTO .....</b>	<b>32</b>
<b>1.1.12 CONTROLE E PROFILAXIA.....</b>	<b>36</b>
<b>1.1.13 CONCLUSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>1.1.14 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>38</b>
<b>2 VIGILÂNCIA ATIVA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO</b>	<b>47</b>
<b>MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PARANÁ.....</b>	<b></b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>47</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>48</b>
<b>2.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
2.2.1 LOCAL DO ESTUDO.....	51
2.2.2 AMOSTRAS E EXAMES .....	52
<b>2.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>54</b>
<b>2.2.4 RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
<b>2.2.5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>2.2.6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>63</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	ACHADOS CLÍNICOS EM 80 CÃES COM LEISHMANIOSE.....	26
Tabela 2 -	ACHADOS CLÍNICOS ASSOCIADOS A CÃES PORTADORES DE LEISHMANIOSE VISCERAL.....	27
Tabela 3 -	EXAMES LABORATORIAIS UTILIZADOS PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE CANINA.....	29
Tabela 4 -	DISTRIBUIÇÃO DOS CÃES ESTUDADOS ORIUNDOS DO CENTRO DE CONTROLE DE ZOONOSES (CCZ) DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PR, NO PERÍODO DE FEVEREIRO DE 2006 A JULHO DE 2007, DE ACORDO COM O SEXO, PORTE, IDADE, RAÇA E SITUAÇÃO DOMICILIAR.....	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	MAPA DO ESTADO DO PARANÁ COM DESTAQUE PARA O MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS – PR.....	51
Figura 2 -	DISTRIBUIÇÃO DAS COLHEITAS DE SANGUE EM 18 MESES.	52



## **LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

°C – Grau Celsius

CCZ – Centro de Controle de Zoonoses

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ELISA - Ensaio Imunoenzimático

FML – Ligante fucose manose

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde

Hab - Habitantes

HE – Hematoxilina & Eosina

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio

IFD – Imunofluorescência direta

IgG – Imunoglobulina G

IL – Interleucina

IM – Intramuscular

IV - Intravenoso

IVDN – Índice de vegetação diferente normalizado

Kg - Kilograma

Km - Kilômetro

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose Visceral

LVC – Leishmaniose visceral canina

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

mg – Miligrama

mL - Mililitro

MS - Ministério da Saúde

OMS - Organização Mundial da Saúde

ON – Óxido nítrico

OPD - Substrato ortofenilenodiamino

PCR - Reação em Cadeia de Polimerase

PR – Paraná

RIFI – Reação de imunofluorescência indireta

RJ – Rio de Janeiro

RNA<sub>m</sub> - Ácido ribonucleico mensageiro

rpm – Rotações por minuto

Sb<sup>5+</sup> - Stibogluconato de sódio

SC – Subcutâneo

SMF – Sistema mononuclear fagocitário

SP – São Paulo

TCD4 – Grupo de linfócitos diferenciados 4

TH – Células T efetoras (T helper)

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral

UFPR – Universidade Federal do Paraná

UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu

## RESUMO

A leishmaniose, doença causada pelo protozoário *Leishmania sp.* é considerada uma doença reemergente e em franca expansão no Brasil, apresentando significativo aumento de casos em seres humanos e caninos em áreas endêmicas. No ambiente doméstico, o cão é considerado o principal reservatório. A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é encontrada em todos os países tropicais e subtropicais do mundo, exceto na Austrália, na Nova Zelândia e em algumas ilhas do pacífico. No Estado do Paraná existem regiões endêmicas desta zoonose, com sérios problemas para a saúde pública. Já a Leishmaniose Visceral, está distribuída em municípios de todas as unidades federadas, com exceção da região sul. No estado do Paraná a enfermidade ocorre em regiões endêmicas como o Vale do Ribeira com sérios problemas para a saúde pública. O controle da Leishmaniose depende da viabilidade e especificidade de métodos diagnósticos. O objetivo deste trabalho foi determinar a soroprevalência da leishmaniose em cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses do município de São José dos Pinhais – PR. Ao conhecer a situação desta zoonose em uma população randomizada de cães oriundos de vários bairros deste município, de área não endêmica, será possível identificar a ocorrência nesta região. Comparou-se, o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e a Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) para Leishmaniose em cães com o objetivo de verificar o nível de anticorpos contra *Leishmania sp* nos soros de cães que habitam o município de São José dos Pinhais. Das 364 amostras de sangue de cães colhidos durante o período de fevereiro de 2006 a julho de 2007 somente uma amostra de um cão macho, porte grande, adulto, sem raça definida apresentou-se sororeagente no ELISA e nenhuma amostra teve resultado positivo para a RIFI. Foi também realizado imprint de linfonodo poplíteo de 50 cães para possível detecção de formas amastigotas de *Leishmania*, onde não foram observadas formas do parasita. Os resultados deste estudo permitem concluir que ao elucidar a prevalência da doença na população de cães do município de São José dos Pinhais a Leishmaniose tem baixíssima prevalência. A viabilidade e especificidade de métodos diagnósticos são ferramentas efetivas no controle e monitoramento preventivo da doença, embora os mesmos não foram testados devido ao baixíssimo índice de animais soropositivos.

Palavras-chave: Leishmania, Cão, ELISA, RIFI, São José dos Pinhais-PR

## ABSTRACT

The leishmaniosis, disease caused by the protozoo *Leishmania sp* is considered a re-emergent affection in high expansion in Brasil, presenting significative increase of disease in human and dogs in endemic areas. In the domestic environment, the dog is considered the main reservoir. The American Tegumentar Leishmaniosis is found in all tropical and subtropical countries of the world, except Australia, New Zealand and some islands of the pacific. In Paraná State, there are endemic regions of this zoonosis, with serious public health problems. However, the visceral leishmania is distributed in all cities of federative unity, with exception of south region. In the Paraná State, Leishmaniosis exist in endemic regions like Vale do Ribeira with serious problems to public health. The control of the leishmaniosis depend on the viability and specificity of diagnostic methods. The aim of this work was to determine the soroprevalency of leishmaniosis in dogs from the in the Control Center of Zoonosis of the São José dos Pinhais city, Paraná State. The knowledge of this zoonosis situation in a random population of dogs from the various district of this city, non endemic area, shall be possible to identify focus of dissemination in this region. Imunoenzyme Assay (ELISA) and Indirect Immunofluorescence Reaction (RIFI) were compared to detect dogs Leishmaniosis to verify the antibody level against *Leishmania sp* on the dogs serum that lives in the São José dos Pinhais city. From the 364 blood samples collected during the period of february 2006 to July 2007, only one male, mongrel dog, adult, large breed was serum reagent for ELISA and no sample had positive result to the RIFI analysis. Imprints of popliteal lymphnode from 50 dogs also were analysed to detect the amastigote forms of *Leishmania*, no dog were positive. By the results of this study, it allow to conclude that by elucidation of the prevalence of this disease in the dog population of São José dos Pinhais city have low prevalence. The viability and specificity of the diagnostic methods are effective keys to control and preventive monitoring of the disease, in despite of these methods do not were tested due to the low register of soropositive animals.

Key words: *Leishmania*, Dog, ELISA, RIFI, São José dos Pinhais-PR

## 1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose, doença causada pelo protozoário *Leishmania sp.* é considerada uma doença re-emergente, apresentando significativo aumento de casos em seres humanos e caninos em áreas endêmicas. No ambiente doméstico, o cão é considerado o principal reservatório. No Estado do Paraná existem regiões endêmicas desta zoonose, com sérios problemas para a Saúde Pública.

A pele é a porta de entrada para a infecção, pela qual a fêmea do inseto vetor inocula junto com a saliva as formas infectantes da *Leishmania*. A infecção ocorre quando os parasitas induzem uma infiltração focal ou difusa de macrófagos não parasitados, além de infiltrado de linfócitos e células plasmáticas, com focos de plasmacitogênese. A via de disseminação de *Leishmania* pode ser a hematogênica e/ou linfática e em cães têm sido encontrada no sangue periférico. As alterações mais particulares são encontradas em tecido esplênico, hepático, sanguíneo, pulmonar e renal.

A patogenia da doença é determinada por múltiplos fatores que envolvem os hospedeiros e os parasitos, o estado imunológico e nutricional do indivíduo, além de fatores genéticos determinantes da susceptibilidade para a infecção e para a cura.

O diagnóstico da Leishmaniose depende da viabilidade e especificidade de métodos laboratoriais, como: ELISA, RIFI, IFD, exame parasitológico direto, (punção de linfonodo e medula), Imunoistoquímica e PCR. O objetivo desta revisão foi oferecer bases para o entendimento das alterações celulares e bioquímicas que ocorrem em pacientes com Leishmaniose, e com isso, as novas propostas de controle sejam mais facilmente assimiladas.

### 1.1 REVISÃO DE LITERATURA

#### 1.1.1 CLASSIFICAÇÃO ZOOLÓGICA

A Leishmaniose é uma enfermidade causada por protozoários pleomórficos do gênero *Leishmania*, da Ordem Kinetoplastida e família Tripanosomatidae, que

são classificadas em *Leishmania chagasi* e *Leishmania (Viannia) brasiliensis* (REY, 2001b). De acordo com a espécie, podem produzir manifestações cutâneas, mucocutâneas, cutâneas difusas e viscerais (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2003; REY, 2001b). No Brasil, o principal vetor da Leishmaniose visceral ou também conhecida como calazar, é a *Lutzomyia longipalpis* (mosquito palha, birigui). Os hospedeiros vertebrados são animais selvagens (roedores, gambás, tamanduás, tatus, primatas, raposas e preguiças), animais domésticos (cães, gatos e eqüinos) e o homem. No ambiente doméstico, o cão (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758) é considerado o principal reservatório (FEITOSA, 2006).

### 1.1.2 CICLO BIOLÓGICO

Dentro da cadeia epidemiológica, a *Leishmania* completa sua evolução em dois hospedeiros. Inicialmente, os flebotomíneos (*L. longipalpis*) ao se alimentarem de sangue do hospedeiro infectado, ingerem as formas infectantes não-flageladas denominadas de amastigotas (ovóides ou arredondadas, 2.5 a 5 µm de comprimento e 1.5 a 2 µm de largura) que se encontram livres ou no interior do macrófago. Amastigotas multiplicam por fissão binária, rompem os macrófagos quando eles se tornam ingurgitados com sangue do hospedeiro infectado. No interior do tubo digestivo do inseto, o protozoário evolui para a forma flagelar denominada promastigota, que é inoculada na pele de outro hospedeiro vertebrado sadio no momento do repasto sanguíneo do mosquito. Depois da inoculação dentro do hospedeiro, as promastigotas perdem seus flagelos e transformam novamente em amastigotas. (LITTLE, 2006).

Estes insetos vetores vivem em ambientes variados, mas suas formas imaturas se desenvolvem em ambientes terrestres úmidos, ricos em matéria orgânica e de baixa incidência luminosa (NEVES, 2005; REY, 2001b). O mosquito tem sua atividade crepuscular e noturna para picar os seus hospedeiros (LITTLE, 2006).

Alguns cães sucumbem com a infecção, outros abrigam o patógeno e são resistentes para o desenvolvimento de doença clínica, e alguns são capazes de eliminar o patógeno antes de desenvolver doença clínica.

A infecção canina ocorre em sua maioria em áreas rurais ou arredores das cidades; entretanto, a urbanização de cães e humanos oriundos destas áreas pode ameaçar o bem-estar e contamina cães e humanos. (LITTLE, 2006).

### 1.1.3 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença polimórfica de pele e mucosa, de grande importância na América do Sul, causada pelo protozoário heteróximo pertencente ao gênero *Leishmania* (JESUS; ARAÚJO, 2007). A LTA é encontrada em todos os países das regiões tropicais e subtropicais do mundo, exceto na Austrália, Nova Zelândia e em algumas ilhas do pacífico. No Brasil, a situação da Leishmaniose é alarmante nos dias atuais. A incidência de Leishmaniose cutânea aumentou de 21.800 casos registrados em 1998 para 60.000 em 2003, representando um crescimento de 55% (CASTRO et al., 2005). Este aumento na incidência é atribuído, especialmente, às alterações do meio ambiente, tais como: desmatamento, alterações climáticas, volume de chuvas, aumento da temperatura; habitações construídas com material precário e em locais inapropriados, facilitando assim a disseminação do mosquito transmissor (BASANO, 2004; CASTRO et al., 2005).

Na região Sul o destaque é o Paraná, responsável por 98% dos casos de Leishmaniose tegumentar americana na região, onde demonstrou aumento gradativo no número de municípios com registros de casos, passando de 117 em 1994 para 146 em 1998. O Vale do Ribeira considerado Região endêmica da doença no Paraná, apresenta sérios problemas para a saúde pública. (CASTRO et al., 2005.; JESUS; ARAÚJO, 2007.; ZANZARINI et al.; 2005).

Castro et al. (2005), realizaram levantamento eco-epidemiológico da Leishmaniose cutânea e mucocutânea no Vale do Ribeira, no estado do Paraná, durante 10 anos em zonas rurais, onde foram constatados 339 novos casos, com

prevalência de lesões cutâneas em trabalhadores rurais (36%), donas de casa (18%) e jovens estudantes (31%). Os autores relataram somente um caso de Leishmaniose mucocutânea. A sorologia de cães pelo método diagnóstico RIFI entre 1998-1999 demonstrou 15,1% (24/159) de cães soro-reativos. Sete animais silvestres (raposa, gambá e marsupiais) foram capturados na mesma localidade, porém nestes não foram encontrados nenhum animal soro reagente.

Zanzarini et al., (2005) estudaram a ocorrência da leishmaniose durante o período de 1999 a 2002 em localidades rurais do norte do Paraná e constataram a infecção na população canina em área endêmica simultaneamente com a humana. Dos 67 cães estudados, 14 (20,9%) tinham lesões sugestivas de leishmaniose tegumentar americana, dos quais 3 (21,4%) estavam infectados por *Leishmania sp.* A ocorrência simultânea de leishmaniose humana e canina indica a necessidade de estudos adicionais para esclarecer o papel do cão no ciclo de transmissão do parasito nessas áreas.

Já a Leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença de potencial zoonótico e distribuição Mundial, causada por protozoários do gênero *Leishmania* do Complexo *L. donovani*. Nas Américas, o agente etiológico é a *L. chagasi*, enquanto que na Europa, Ásia e África, os agentes responsáveis são a *L. infantum* e *L. donovani*. No Brasil, a doença é causada pela *L. chagasi*, espécie semelhante a *L. infantum* encontrada em alguns países do Mediterrâneo e da Ásia (CAMARGO et al, 2007).

A estimativa mundial de casos novos anuais é de 1,5 milhão, embora somente 300.000 casos/ano sejam notificados a Organização Mundial de Saúde (JESUS; ARAÚJO, 2007).

Cerca de 90% dos casos de LV das Américas ocorre no Brasil, sendo que a região nordeste apresenta 94% de todos os casos de LV registrados, especialmente nos estados do Piauí, Maranhão, Bahia e Ceará, devido a fatores climáticos favoráveis, temperatura e vegetação (BAVIA et al., 2005).

No ano 2000, foram registrados 3779 novos casos de leishmaniose visceral humana em 18 estados do país. Estima-se que para cada caso humano, ocorra uma média de pelo menos 200 cães infectados. As infecções dos cães precedem sempre



a aparição dos casos humanos, pois o cão é o reservatório da doença para os humanos (DESJEUX, 2003; MONTEIRO et al., 1994).

No Município de Bauru, SP, onde a leishmaniose é uma enfermidade endêmica, houve um aumento significativo no número de casos humanos, mesmo com todas as medidas profiláticas de controle. Em 2003, foram registrados 17 casos, com um óbito. Em 2004, 29 casos, com três óbitos, em 2005, 31 casos, com quatro óbitos. Já em 2006, foram registrados 71 casos e quatro óbitos e até julho de 2007, foram notificados seis casos, sem óbitos (CAMARGO et al., 2007).

### 1.1.4 PREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE

Santos et al., (2005), determinaram a prevalência de infecção canina em áreas endêmicas da Leishmaniose cutânea americana no distrito de Paracambi, RJ, entre 1992 e 1993. Foram avaliados 179 cães, destes, 138 (77,1%) apresentavam sinais clínicos desenvolvendo hipersensibilidade tardia com antígeno Imunolesh® e respostas sorológicas positivas com a RIFI e ELISA. Dos 9 cães com lesões cutâneas ativas ou feridas suspeitas, 66,7% foram causadas por *Leishmania sp.* 44,4% das infecções produzidas em hamsters, e mostrou crescimento em meio de cultura, no qual foi considerado ser compatível com a espécie de *L. braziliensis*. A prevalência de infecção canina estimada pelo teste cutâneo, RIFI e ELISA foi 10,1; 16,7 e 27,8% respectivamente. A presença da forma clínica e sub-clínica de Leishmaniose tegumentar americana na população canina em associação com infecção humana sugere que o cão possa atuar como fonte de infecção bem como para disseminação da doença.

Em estudo realizado por Ribeiro et al. (2006a) para determinar a prevalência de anticorpos anti-leishmania visceral em cães da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, concluiu-se que do total de 511 soros analisados, 134 foram positivos para *Leishmania*, representando uma prevalência de 26,2%.

Estudos de reservatórios de animais selvagens são relevantes para monitoramento do ciclo de transmissão da doença. Curi et al. (2006) Investigaram a prevalência de anticorpos anti-*Leishmania sp.* em 21 canídeos selvagens (7

*Chrysocyon brachyurus*, 12 *Cerdocyon thous* e 2 *Lycalopex vetulus*) e 74 cães domésticos na região do Parque Nacional da Serra do Cipó norte de Minas Gerais. A prevalência foi de 8,1% nos domésticos e 19% em cães selvagens.

Bavia et al. (2005), descreveram um sistema de informações geográficas e risco de Leishmaniose visceral na Bahia. Os autores constataram que o índice de vegetação diferente normalizado (IVDN) tem mostrado ser um dos fatores de risco mais importantes na área. Valores baixos de IVDN relacionaram a um alto número de flebótomos e alto número de casos positivos de Leishmaniose visceral canina e humana. O tipo de vegetação de caatinga foi a vegetação predominante na área endêmica. Silva et al. (2005) estudaram em barra de Guaratiba, área endêmica de LVA no Rio de Janeiro, por acompanhamento clínico e sorológico. A proximidade com áreas de mata pode ter sido fator relevante para aumentar o risco de infecção por *L. chagasi* nos cães, possivelmente devido à presença de reservatórios silvestres.

A incidência das leishmanioses tegumentar e visceral americana, em cães e em seres humanos encontra-se em expansão no Estado de São Paulo de acordo com Cutolo et al., (2006). Durante o período de 2000 a 2004, 170 flebotomíneos foram capturados em áreas urbanas e peri-urbanas do município de Rio Claro, região centro-leste de São Paulo. Além da *Lutzomyia longipalpis*, a *Nyssomyia neivai* foi a principal espécie vetora na leishmania tegumentar americana no interior paulista, correspondendo a 124 espécimes (72,94%).

Langoni et al (2006), realizaram levantamento epidemiológico canino durante o ano de 2005 para determinar a ocorrência da enfermidade na cidade de Botucatu - SP e outras cidades dos Estados da Bahia e Mato Grosso do Sul utilizando a técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Do total de 521 amostras examinadas, 115 (22,07%) foram positivas. Pode-se confirmar a endemicidade da Leishmaniose canina nestas regiões, devido ao número de amostras reagentes. Com relação à idade, a positividade foi maior nos animais mais jovens e menor nos mais velhos acima de sete anos. Não foi observada diferença quanto a soropositividade entre os sexos.

### 1.1.5 FISIOPATOLOGIA

#### 1.1.5.1 VIAS DE INFECÇÃO E PATOGENIA

Ao picar o hospedeiro, o mosquito transfere as formas promastigotas de *Leishmania* pela saliva que é inoculada na pele. Os promastigotas são então fagocitados pelos macrófagos e multiplicam-se para se tornar amastigotas dentro dos fagolisossomos que os separam das células de defesa do hospedeiro. Quando o macrófago se rompe, amastigotas livres penetram as células hospedeiras e disseminam-se do local da picada. Estes percorrem pelo corpo do hospedeiro, inicialmente por órgãos do sistema linfático e áreas dérmicas remotas para criar infecção generalizada (LITTLE, 2006). A via de disseminação de *Leishmania* pode ser a hematogênica e/ou linfática. *Leishmania chagasi* raramente tem sido encontrada no sangue periférico humano de indivíduos considerados imunocompetentes (NEVES, 2005).

A *Leishmania chagasi* é um parasito de células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), principalmente do baço, fígado, linfonodos e medula óssea. Entretanto, no curso da infecção, outros órgãos e tecidos podem ser afetados (CIMERMAN, 1999).

Caso a infecção se instale, os parasitos induzem uma infiltração focal ou difusa de macrófagos não parasitados, além de infiltrado de linfócitos e células plasmáticas, com focos de plasmacitogênese. As alterações mais particulares são encontradas em tecido esplênico, hepático, sanguíneo, pulmonar e renal (REY, 2001b).

A infecção inicialmente não apresenta sintomas, mas tardiamente pode progredir a doença sintomática ao menos que a replicação das amastigotas seja cessada pelo mecanismo imunológico. Cães que são capazes de resistir a uma infecção de modo a resolver e eliminar o parasita ou restringir a infecção e permanecer assintomático são clinicamente resistentes. Animais que são predispostos para desenvolverem uma infecção e doença sintomática são considerados suscetíveis. (LITTLE, 2006).

A patogenia da doença é determinada por múltiplos fatores que envolvem os hospedeiros e os parasitos, além dos fatores genéticos determinantes da

susceptibilidade para a infecção e para a cura e ainda o estado imunológico e nutricional do indivíduo (NEVES, 2005).

#### 1.1.5.2 ALTERAÇÕES CUTÂNEAS

As alterações cutâneas que podem ocorrer são: edema, alopecia local ou generalizada, dermatite esfoliativa e ulcerações crostosas em geral no focinho, nas orelhas e nas extremidades, descamação furfurácea e a presença de nódulos cutâneos que eventualmente podem ulcerar (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2003; QUEIROZ et al., 2006).

Queiroz et al. (2006) realizaram exames parasitológico e histopatológico de tecidos cutâneos de 34 cães infectados com Leishmaniose visceral em Ilha Solteira, SP. Os dados revelaram que, de acordo com os sinais clínicos foram observados oito cães assintomáticos, sendo 50% negativos e 50% positivos, apresentando graus variados de infecção parasitária. Em 17 cães oligossintomáticos, 12% apresentavam-se negativos e 88% apresentavam graus variados de infecção parasitária. Em nove cães sintomáticos todos apresentavam-se positivos. Na histopatologia foi observada presença maciça de formas amastigotas no interior de macrófagos ou livres pelo tecido. Em alguns casos, os parasitos encontravam-se na epiderme, derme, hipoderme e entre as fibras musculares. Mas na maioria, as células infectadas encontravam-se logo abaixo da epiderme próxima de vasos sanguíneos, dos folículos pilosos e das glândulas sebáceas. A maioria das lesões (92%) encontradas nos animais sintomáticos era de caráter crônico, com infiltrado predominante de macrófagos, plasmócitos e linfócitos, principalmente ao redor dos folículos e glândulas anexas, com discreta vascularização e edema de derme. Somente 40% dos animais que não apresentaram lesão aparente estavam positivos para *Leishmania* na Reação de Imunofluorescência direta.

### 1.1.5.3 ALTERAÇÕES ESPLÊNICAS E HEPÁTICAS

Alterações esplênicas como esplenomegalia na doença estabelecida ou crônica são achados evidentes na necropsia. Ao corte o órgão apresenta superfície vermelha amarronzada e o tecido friável e congesto. Ocorre hiperplasia e hipertrofia das células do Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF), os macrófagos e as células plasmáticas podem ser observados densamente parasitados, na polpa branca e vermelha (ANDREOLI, 1998).

No fígado pode-se encontrar hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer, em geral densamente parasitadas pela forma amastigota. É freqüente a presença de infiltrado difuso de células plasmáticas e linfócitos, intraparenquimal. Podem ser observados fibrose septal e portal, leve ou moderada, ao longo do infiltrado inflamatório. Uma característica marcante do calazar é a hepatomegalia. (ANDREOLI, 1998; NEVES, 2005; REY, 2001a).

Silveira et al. (2006), examinaram tecidos hepáticos de 34 cães infectados com Leishmaniose visceral, caracterizando clinicamente cães como: assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Estes autores observaram que 8 cães eram assintomáticos, destes, 37% estavam negativos e os 63% positivos apresentaram graus variados de infecção parasitária. Esta infecção causou lesões hepáticas que foram caracterizadas por congestão portal, hemorragias nos sinusóides e hepatócitos com leve vacuolização. Em 17 cães oligossintomáticos, 35% eram negativos e 65% apresentaram graus variados de infecção parasitária com predominância de células mononucleares. Nove cães foram sintomáticos, sendo todos positivos, apresentando extensa congestão venosa portal com infiltrado de células mononucleares e alguns eosinófilos, muitos granulomas difusos pelo tecido com macrófagos infectados e/ou com hemossiderina, plasmócitos e linfócitos, alteração gordurosa dos hepatócitos (esteatose macro e microvesicular), degeneração hidrópica em graus variados e sinusóides dilatados ou obstruídos por células inflamatórias.

#### 1.1.5.4 ALTERAÇÕES NO TECIDO HEMATOPOIÉTICO

A eritropoiese e a granulopoiese são normais no início do processo infeccioso. Durante as fases mais adiantadas da infecção, ocorre desregulação da hematopoiese, caracterizada pela diminuição da produção celular, com reflexo no quadro hematológico em períodos sucessivos de hiperplasia no setor histiocitário e hipoplasia de medula óssea e por fim, aplasia (NEVES, 2005). As plaquetas também estão diminuídas nos quadros graves e letais, principalmente nas fases mais adiantadas da doença, o que facilita a gênese de hemorragias (BEVILACQUA, 1998; NEVES, 2005).

A anemia é o achado mais freqüente nos pacientes doentes, em geral a anemia é normocítica e normocrômica. Entre os mecanismos envolvidos na anemia está a destruição dos eritrócitos no baço, a fagocitose e a hemólise, que podem ser imunologicamente mediadas. A medula óssea é em geral encontrada com hiperplasia e densamente parasitada (NEVES, 2005; ANDREOLI, 1994).

#### 1.1.5.5 ALTERAÇÕES NOS LINFONODOS

Os linfonodos encontram-se freqüentemente edemaciados quando os animais apresentam-se sintomáticos. Ocorre reatividade nos centros germinativos dos folículos linfóides, reflexo do aumento na celularidade perifolicular. Na zona paracortical há depleção das células T e presença de plasmócitos e macrófagos parasitados. A presença destes plasmócitos explica, em parte, a hipergamaglobulinemia presente durante a infecção. (HARRISON, 1962; PESSÔA, 1988).

#### 1.1.5.6 ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS

Na infecção por *Leishmania*, citocinas inflamatórias são liberadas predominantemente pelos monócitos e linfócitos, onde agem como substâncias

mediadoras (NEVES, 2005). Os monócitos ativados liberam citocinas pró-inflamatórias do tipo fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e IL-1. Os linfócitos T helper obtidos a partir do clone TH-0 originam 2 fenótipos diferentes de citocinas: TH-1 e TH-2. O TH-1 é expresso pela produção das linfocinas: Interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-3 e IL-12. Este tipo de resposta é basicamente intracelular, a nível de macrófagos a exemplo do que acontece nas infecções virais. O TH-2 é estimulado pelos linfócitos B, responsáveis basicamente contra as infecções parasitárias, este expresso pela produção de IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, sendo que a produção de IL-5 é traduzida pela eosinofilia, de IL-3 pela proliferação dos mastócitos e da IL-4 pela produção de imunoglobulina E. A doença classicamente descrita nestes casos é a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (sepse) que está relacionada à conseqüente manifestação do hospedeiro à reação inflamatória desencadeada frente a uma infecção grave por leishmania, onde há produção excessiva de mediadores de processos intra e extracelulares, tais como óxido nítrico (ON), importante radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, envolvido no relaxamento vascular e tem papel importante na proteção dos vasos sanguíneos, resultando em inibição da adesão e agregação plaquetária, além de ser potencialmente tóxico em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante (BENJAMIM, 2001; CERQUEIRA et al, 2002; DUSSE et al., 2003).

A principal conseqüência desta resposta inflamatória é o comprometimento de muitos órgãos e o quadro de choque com evolução para a síndrome da insuficiência de múltiplos órgãos, que é acompanhada de alta mortalidade em seres humanos e nos animais (BENJAMIM, 2001; DUSSE et al., 2003; ROITT, 1997).

A resposta TH-1, com liberação de TNF- $\alpha$  e IL-2, induziu lesões semelhantes ao do choque séptico em vários modelos animais (ratos) e estudos clínicos em humanos (MARKS et al., 1990; SCHADE, 1990). Pentoxifilina e amrinone atuam a nível de pré-tradução e são inibidores da fosfodiesterase que aumenta os níveis de AMPc intracelular. Essas duas drogas diminuem a produção celular de TNF- $\alpha$  (BEUTLER et al., 1986; SCHADE, 1990). O mesmo ocorre com os corticosteróides que bloqueiam a tradução do RNAm e do TNF em macrófagos, reduzindo a secreção de TNF após a endotoxemia (GRIESMAN, 1982; KASS; FINLAND, 1958).

Sabe-se que o TNF estimula a liberação de outras citocinas, como a IL-1 e IL-6, Interferon- $\gamma$  e IL-12. A interleucina-1 é formada por duas moléculas diferentes; IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Quando administrada em animais ou seres humanos, produz vários efeitos observados semelhante ao TNF exógeno, como febre, anorexia, sonolência e hipotensão (KRIEGLER et al., 1988; LIBERT et al., 1990). A IL-1 produz aumento na concentração de fatores estimuladores de colônia, de IL-6, aumento das proteínas de fase aguda hepática, reabsorção óssea, inibição da lipoproteína-lipase e síntese do colágeno (FISCHER, 1991).

Lima; Peiro; Vasconcelos, (2006) avaliaram a produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  no soro de 16 cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. A alta produção de IL-6 observada neste grupo sugere que esta citocina possa ser um marcador de doença ativa, por outro lado outras citocinas devem estar envolvidas com a hipergamaglobulinemia observada na infecção.

A Leishmaniose visceral é caracterizada pela incapacidade do macrófago em destruir as formas amastigotas. Em animais doentes, tem sido observada a produção de níveis elevados de IL-10. O aumento de IL-10 em sinergismo com IL-4 parece ser fundamental na progressão da doença, sendo que ambas são capazes de inibir a ativação de macrófagos pelo TNF- $\gamma$  produzido pelas células TCD4+ a transcrição do TNF- $\alpha$  e a produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (NEVES, 2005).

A produção de anticorpos, principalmente IgG, se apresenta elevada quando há infecção crônica. Entretanto, como a ativação do Linfócito B é policlonal, a maioria das imunoglobulinas são inespecíficas. Devido a este fato o organismo não tem capacidade de controlar por mecanismos celulares a infecção. A detecção de anticorpos específicos contra *Leishmania* é importante, principalmente para o diagnóstico.

Dossi et al. (2006), investigaram em 30 cães assintomáticos naturalmente infectados por *L. chagasi* a produção de IgG contra antígenos totais de *Leishmania*. Os resultados indicaram que há uma diferença na produção de citocinas no baço e no fígado, e que alta produção das citocinas IL-10 e TNF- $\beta$ , quando comparado com a produção de TNF- $\gamma$ , sugere a predominância da resposta imunológica para o tipo



TH-2 onde estes eventos perpetuam a infecção, tornando a doença progressiva e eventualmente letal, se não controlada (NEVES, 2005).

#### **1.1.6 ACHADOS CLÍNICOS**

A LVC é usualmente uma doença sistêmica crônica e os sinais clínicos da doença desenvolvem-se de 3 meses a 7 anos após a infecção (LITTLE, 2006). Os sinais da doença são amplamente variáveis (Tabela 1) e muitas vezes começam com fraca, mas progressiva intolerância ao exercício.

A prevalência de lesões cutâneas em cães com Leishmaniose sintomática variam entre 56 a 90% (CIARAMELLA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999; SLAPPENDEL, 1988). Aproximadamente 20 a 40% dos cães diagnosticados com Leishmaniose visceral apresentam lesões oculares, incluindo ceratoconjuntivite e uveíte linfoplasmática ou granulomatosa. (CIARAMELLA et al. 1997; GARCIA-ALONSO et al., 1996, PENA et al., 2000, SLAPPENDEL, 1988).

Unhas anormais ou quebradiças (onicogrifose), achados não específicos, desenvolvem em 20% dos pacientes (JUTTNER et al., 2001). Caquexia e atrofia muscular são os sinais mais comuns de envolvimento visceral. Alguns cães perdem peso apesar do apetite voraz. A piora da condição é freqüentemente associada com insuficiência renal. A progressiva falha renal pode ser acompanhada por anorexia, depressão mental, poliúria, polidipsia e vômito. A temperatura retal pode flutuar, mas usualmente é normal ou não febril (LITTLE, 2006).

TABELA 1 - ACHADOS CLÍNICOS EM 80 CÃES COM LEISHMANIOSE (SLAPPENDEL, 1988).

ACHADOS	PORCENTAGEM DE CÃES
ACHADOS CLÍNICOS	
Intolerância ao exercício	67.5
Perda de peso	64
Sonolência	60
Entrada de fluido aumentada	40
Anorexia	32.5
Diarréia	30
Vômito	26
Polifagia	15
Epistaxe	15
Melena	12.5
Espirros	10
Tosse	6
Debilidade	6
ANORMALIDADES NO EXAME FÍSICO	
Linfadenomegalia	90
Envolvimento cutâneo	89
Caquexia	47.5
Locomoção anormal	37.5
Hipertermia	36
Conjuntivite	32.5
Baço palpável	32.5
Unhas anormais	20
Rinite	10
Ceratite	7.5
Pneumonia	2.5
Icterícia	2.5
Uveíte	1.3
Panoftalmite	1.3

### 1.1.7 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico se dá com base nos sinais clínicos tais como dermatopatias (Tabela 2) de ocorrência comum na Leishmaniose visceral canina, apresentando: alopecia local ou generalizada, dermatite esfoliativa e ulcerações crostosas em geral no focinho, nas orelhas e nas extremidades, descamação furfurácea e a presença de nódulos cutâneos que eventualmente podem ulcerar (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2003; QUEIROZ et al., 2006).

TABELA 2 – ACHADOS CLÍNICOS ASSOCIADOS A CÃES PORTADORES DE LEISHMANIOSE VISCERAL

Dermatopatias	Lesões hematopoiéticas	Oftalmopatias	Lesões Sugestivas/Imunomediadas
Alopecia	Hepatomegalia	Conjuntivite	Vasculite
Lesões na orelha e focinho	Esplenomegalia	Ceratoconjuntivite	Artrite
Nódulos e ulcerações		Úlcera de córnea	
Acinesia		Hifema	
Onicogrifose		Uveíte	

A onicogrifose também tem sido relatada na literatura como importante sinal em cães provenientes de áreas endêmicas e hepatoesplenomegalia como sinal clínico comum na doença (ANDREOLI, 1998; QUEIROZ et al., 2006; REY, 2001a; SILVEIRA et al., 2006).

Feitosa et al. (2000) descreveram aspectos clínicos de 215 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral no município de Araçatuba, SP. As alterações mais frequentes foram: linfadenomegalia (81%) seguida de alterações dermatológicas (queda de pêlos, lesões ulcerativas, prurido intenso, pelame opaco e dermatite seborréica (68%); hiporexia (58%); onicogrifose (51%) e emaciação (47%). A anemia foi identificada em 30% dos casos; assim como sinais oculares caracterizados por uveíte (29%); hipertermia (21%); emese (20%); diarreia (20%) e melena (10%); quadros de pneumonia (19%), e de epistaxe (3%). Outros achados

importantes foram: o comprometimento do sistema urinário em 19%, e as alterações hepáticas em 17% dos cães. Alterações neurológicas foram em menor frequência 4%.

A leishmaniose visceral pode ser ainda considerada como doença imunomediada, devido à formação de depósitos de imunocomplexos circulantes, que são os causadores de sinais como vasculite, uveíte, glomerulonefrite e artrite. Algumas oftalmopatias também têm sido relatadas como a ceratoconjuntivite, úlcera de córnea, hifema e conjuntivite (FEITOSA, 2006).

No entanto, existe um grande percentual de animais assintomáticos, havendo opiniões contrárias na literatura em relação à cura espontânea. É importante lembrar que em muitos casos os animais não apresentam sinais clínicos, mas possuem sorologia positiva, atuando desta forma como eficientes reservatórios da enfermidade (REY, 2001a).

Apesar do diagnóstico clínico ser importante, não se aconselha realizar o diagnóstico de Leishmaniose visceral canina isoladamente, sendo necessário o exame laboratorial direto e indireto, para confirmação de cada caso (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2003; LUVIZOTTO, 2006).

O diagnóstico da Leishmaniose canina (Tabela 3) é, muitas vezes, um problema para o Veterinário. Isso se deve a grande variedade de sinais clínicos observados em cães, alterações histopatológicas inespecíficas e lesões semelhantes às observadas em outras doenças infecciosas e imunomediadas e a ausência de um teste diagnóstico 100% específico e sensível (LUVIZOTTO, 2006).

O diagnóstico definitivo de leishmaniose pode ser confirmado pela demonstração microscópica do parasita em preparações citológicas ou amostras histopatológicas, sorologia, cultura do organismo em meio de cultura apropriado, ou detecção do DNA do parasita através de métodos moleculares (LITTLE, 2006)

TABELA 3 - EXAMES LABORATORIAIS UTILIZADOS PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE CANINA.

<b>Métodos diagnósticos</b>	<b>Material</b>	<b>Técnica</b>	<b>Referência</b>
<b>Métodos parasitológicos</b>			
Histopatologia	Tecido lesionado	Giemsa	Luvizotto, (2006)
	Linfonodo	Leishman Giemsa	Luvizotto, (2006)
Imunohistoquímica	Tecido lesionado		
Raspado de pele Biópsia incisional	Tecido cutâneo	Romanowski	Luvizotto, (2006)
“Imprint” de linfonodo	Linfonodos	Romanowski	Luvizotto, (2006)
Biópsia aspirativa por agulha fina	Tecido lesionado	Romanowski	Luvizotto, (2006)
	Linfonodos (poplíteo)	Romanowski	Luvizotto, (2006)
	Baço (ultra-som)	Romanowski	Luvizotto, (2006)
	Medula óssea	Romanowski	Luvizotto, (2006)
Cultivo celular <i>in vitro</i>	Linfonodos (poplíteo)	Isolamento	Luvizotto, (2006)
	Medula óssea	Romanowski	Luvizotto, (2006)
<b>Métodos sorológicos</b>			
Imunofluorescência indireta	Fragmentos de linfonodo	RIFI	Ishizaki et al (2006); Luvizotto (2006)
	Sangue circulante	RIFI	
Elisa	Sangue circulante	Ensaioimuno enzimático	Rey, (2001)
Fixação de complemento	Sangue circulante	Reação de Montenegro	Rey, (2001)
<b>Métodos moleculares</b>			
Reação da Cadeia de Polimerase - PCR	Sangue circulante	Amplificação do DNA	Nunes, (2006)
	Linfonodo Pele		Velasquez, (2006)
Western Blot	Sangue circulante		Silva et al, (2005)
	Linfonodo		
	Pele		Rey, (2001)

Mesmo que a forma de diagnóstico mais precisa seja a demonstração do parasito pelo exame direto de amostras colhidas de sangue periférico ou pele, apenas eventualmente serão encontradas formas amastigotas de *Leishmania sp.* em macrófagos circulantes, não sendo indicados como único método de escolha. Entretanto usa-se o diagnóstico em cães pelo exame sorológico de reação de

imunofluorescência indireta (RIFI), kit Biomanguinhos, sendo resultado considerado positivo o título igual ou superior a 1:40 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2003). A técnica de RIFI é um dos métodos mais comumente utilizados sendo a prova adotada como padrão ouro pelo Ministério da Saúde, portaria nº 1943 onde a Leishmaniose é uma das Doenças de Notificação obrigatória em todo território Nacional.

### **1.1.8 TESTES SOROLÓGICOS**

Vários métodos sorológicos têm sido usados para detectar anticorpos soro anti-leishmania. Testes como a RIFI, Ensaio Imunoenzimático (ELISA), Ensaio de Aglutinação Direta e Western Blotting. Em geral, estes métodos têm boa sensibilidade e especificidade diagnóstica na leishmaniose visceral clínica. Cães infectados assintomáticos que desenvolvem lentamente a doença são freqüentemente soropositivos (LITTLE, 2006). Em casos de resultados sorológicos inconclusivos, recomendam-se outros métodos adicionais de detecção (INIESTA et al., 2002).

### **1.1.9 IDENTIFICAÇÃO DO PARASITA PELA MICROSCOPIA E CULTURA**

O diagnóstico definitivo da leishmaniose normalmente se baseia na identificação citológica e histológica de amastigotas – contida nos macrófagos e livres – em lâminas coradas de linfonodos, aspirados esplênicos, impressões de pele, ou medula óssea. A especificidade destes métodos, dependendo do tempo gasto para verificar os parasitas é de aproximadamente 80% em cães com sinais clínicos de doença e baixo em cães soropositivos assintomáticos. (LITTLE, 2006).

A punção aspirativa de medula óssea, de linfonodos, raspados de pele lesionada, isolamento em meio de cultura e ainda a prova biológica, xenodiagnóstico, que consiste na inoculação intraperitoneal do material suspeito em hamsters (*Mesocricetus auratus*) são alguns outros métodos eficientes e

comprovados de diagnóstico (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2003; LUVIZOTTO, 2006).

Azadeh et al. (1994), detectaram linfadenite leishmânica pelo estudo imunoistoquímico. A imunomarcagem com anticorpo para *Leishmania sp.* identificou numerosas amastigotas em células trofoblásticas.

O material proveniente da aspiração “imprint” pode ser corado pelo método de Romanowski, fazendo-se pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania sp.* no interior de macrófagos ou livres. O achado de uma forma amastigota é conclusivo para o diagnóstico da doença (LUVIZOTTO, 2006).

Ishizaki et al. (2006), examinaram 363 amostras de soro de cães encaminhados ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do Município de Araçatuba, SP, pela RIFI e exame parasitológico direto de fragmentos de linfonodos. Nestes, foram encontradas 119 amostras (32,8%) contendo formas amastigotas de *Leishmania sp.* Sendo que por meio da RIFI, 176 animais (48%) foram soropositivos. Em 82 animais (22,6%) soropositivos, não foram observados parasitos nos linfonodos, e 25 cães (6,9%) não reagentes pela RIFI apresentaram “imprints” positivos. Demonstrou-se discordância de sensibilidade e especificidade na detecção de infecção por *Leishmania sp.* em cães, quando as técnicas foram comparadas.

#### **1.1.10 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)**

Dentre os métodos moleculares, a reação em cadeia da polimerase (PCR), permite identificar e ampliar seqüências de DNA do parasita que podem ser encontrados em uma variedade de tecidos como: medula óssea, aspirados de linfonodos, biópsias cutâneas, sangue, cortes histológicos de tecidos parafinados e também no vetor. Em amostras de medula óssea a PCR tem apresentado melhores resultados em relação ao sangue e a pele, pois nas amostras de sangue a sensibilidade é baixa, provavelmente devido ao número de parasitas presentes no sangue periférico (GARCIA; MARCONDES, 2007).

Nunes et al. (2006), avaliaram a PCR para amplificação de DNA de *Leishmania sp.* em amostras de sangue de cães como método diagnóstico da Leishmaniose visceral em áreas endêmicas dos Estados de Minas Gerais e São Paulo. Os resultados de validação da PCR em 166 amostras de cães destes Estados revelaram sensibilidade de 55% e especificidade de 66,3%, considerando-se a RIFI como técnica padrão. A baixa sensibilidade observada para a PCR em amostras de sangue não favorece a sua aplicação como ferramenta diagnóstica. Por outro lado, a PCR pode ser de grande valia no diagnóstico individual e no acompanhamento de cães soropositivos no ELISA ou na RIFI.

Velasquez et al. (2005) investigaram a aplicação da PCR no diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana em 143 cães na região noroeste do Paraná. A PCR foi eficaz para o diagnóstico sendo que não houve relação entre a presença de lesão, diagnóstico sorológico e a PCR no sangue. Os autores discutiram que a detecção de DNA do parasito no sangue pode indicar a ocorrência de disseminação hematogênica do parasito, reforçando a hipótese que os cães podem atuar como possíveis reservatórios secundários de *Leishmania tegumentar americana* em algumas áreas.

### 1.1.11 TRATAMENTO

A Leishmaniose canina é mais resistente a terapia do que a Leishmaniose humana, e raramente as leishmanias são completamente eliminadas com os fármacos disponíveis (BANETH et al., 2002).

Por décadas, compostos antimoniais pentavalentes ( $Sb^{5+}$ ) tem sido a droga primária para o tratamento de Leishmaniose visceral canina e humana. Eles inibem seletivamente as enzimas glicolíticas da via oxidativa dos ácidos graxos do parasita, causando sua morte. Dois agentes contendo  $Sb^{5+}$  têm sido administrados em cães: antimoniato de meglumina e stibogluconato de sódio. Antimoniais podem ser administrados por via intramuscular (IM), subcutânea (SC) ou intravenosa (IV) diariamente e podem causar sérios efeitos adversos como mialgia, artralgia, astenia, náusea, febre, anemia, leucopenia, insuficiência renal, pancreatite, cardiotoxicidade



e trombocitopenia (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2003). O efeito clínico e remissão parasitológica é a mesma quando 100 mg/kg de antimoniato de meglumina for administrado IV uma vez ao dia ou SC dividido em duas doses diárias (SLAPPENDEL; TESKE, 1997).

De acordo com Ribeiro et al. (2006b), a terapia antimonial lipossomal, tem sido capaz de reduzir, mas não eliminar a carga parasitária medular de cães naturalmente infectados com *L. chagasi*. A encapsulação de antimônio em lipossomas propicia aumento de sua atividade leishmanicida. Estes autores avaliaram a carga parasitária de 36 cães naturalmente infectados sendo que após 150 dias da terapia com antimoniato de meglumina encapsulados em lipossomas de tamanho reduzido ( $\pm 410\text{nm}$ ), constataram redução da carga parasitária esplênica dos cães infectados cinco meses após o tratamento.

Na Medicina Veterinária, pode-se fazer uso também do alopurinol, um leishmanioestático. Esta droga é mais barata, podendo ser administrada por via oral e apresentando poucos efeitos colaterais. O alopurinol é um análogo da hipoxantina, age se incorporando ao RNA do parasita e alterando a síntese protéica, induzindo uma síntese de proteínas normais. O alopurinol causa hipoxantinúria, a qual pode provocar urolitíases. Isso pode ser prevenido com a administração de uma dieta pobre em proteínas. Como o alopurinol tem um efeito parasitostático, sua ação é maior quando combinado com o uso de outros medicamentos (RIBEIRO et al 2006b). A remissão clínica é freqüentemente obtida com a dose diária de 20 mg/kg entre 4 semanas. Porém reincidência ocorre uma vez cessada a terapia. Mesmo com a administração consciente da droga durante 6 meses, a recuperação completa é rara (LESTER et al., 1996).

Anfotericina B, um polieno macrolítico primário, usado como droga antifúngica, também tem atividade contra alguns protozoários. Este age se ligando ao ergosterol e altera a permeabilidade da membrana celular. A anfotericina tem um forte efeito tóxico em rins de cães causando vasoconstrição e redução no nível de filtração glomerular, possivelmente pela ação direta em células epiteliais renais. Este medicamento pode ser administrado em cães com leishmaniose na forma livre altamente nefrotóxica, emulsão líquida ou formulação lipossomal que reduz seu efeito tóxico e direciona a droga para ser apreendida por macrófagos e se acumula

em órgãos viscerais. Tais terapias são associadas primariamente por efeito colateral transitório e requerem monitoramento cuidadoso de parâmetros renais (LAMOTHE, 2001).

Palatinik de Souza et al., (1994) descreveram em 1989 o antígeno ligante de fucose e manose (FML), o mesmo foi descrito e isolado a partir de formas promastigotas de *L. donovani*. Trata-se de um complexo glicoprotéico que inibe fortemente a penetração de formas promastigotas e amastigotas em macrófagos murinos *in vitro* de uma forma espécie-específica. O FML está presente na superfície da Leishmania durante todo o ciclo, sendo um potente imunógeno para camundongos e coelhos e um antígeno sensível, específico e preditivo no soro diagnóstico de Leishmaniose visceral humana e canina. Essa fração glicoprotéica (FML) é utilizada como antígeno de testes ELISA e tem demonstrado maior sensibilidade para a Leishmaniose visceral canina. Trata-se de um antígeno comum a todas as leishmanias do complexo *donovani*, ou seja, é específico para leishmaniose visceral e não para a tegumentar.

Segundo Ferrer, (1997) a decisão pelo tratamento de cães portadores da Leishmaniose visceral se deve ao conhecimento de que a doença não é uniformemente fatal e de que alguns cães podem apresentar cura espontânea. Em experimentos utilizando tratamentos variados levaram a elaboração de protocolos que oferecem boas possibilidades de cura clínica, baixos índices de recidivas e diminuição ou supressão da capacidade infectante da pele. Entretanto, o tratamento é complexo, prolongado, de alto custo e, em alguns casos, ineficiente, além de que se preconiza a cada três meses exames físicos e laboratoriais, além de sorologia para mensuração do título de anticorpos, bioquímica sérica, hemograma completo, proteinograma e pesquisa de parasitos na pele.

Lima et al, (2006), avaliaram a resposta imunológica celular e humoral contra antígeno total derivado de promastigota e FML em animais imunizados com a vacina Leishmune<sup>®</sup> (Fort Dodge, Saúde Animal, Brasil). A produção de anticorpos contra antígeno total anti-Leishmania e anti-FML foi observada em todos os cães vacinados, sugerindo que a vacina estimula a imunidade humoral. Após 10 dias da vacinação 100% dos cães produziram níveis significativos de IgG contra antígeno total anti-Leishmania e anti-FML. Porém, a imunidade celular em resposta a vacina

foi estimulada em somente 79% do grupo. Os autores sugerem que fatores relacionados a variação genética podem estar associados ao resultado observado.

Outro princípio para prevenção da LVC é a vacinação dos cães livres da infecção. No Brasil, foi registrada e liberada para uso, pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), a primeira vacina do mundo contra LVC. A vacina, chamada Leishmune®, é composta pelo antígeno complexo glicoproteico ligante de fucose e manose (FML) de *L. donovani* e o adjuvante saponina. Seu uso está indicado para cães a partir de quatro meses de idade e consiste de três doses intervaladas por 21 dias e reforço anual a partir da data da primeira aplicação. Os trabalhos que antecederam a produção da vacina em escala comercial para uso em cães, passaram pelo modelo murino até a utilização de cães, nos testes de fase III, que indicaram que a vacina FML induzia um significativo efeito protetor, de 92 a 95%, nos cães vacinados e com uma eficácia vacinal de 76% a 80%. Resultados associados ao uso da vacina Leishmune® em relação a sua segurança e imunogenicidade demonstraram que o produto confere forte soroconversão após completa vacinação e significativo efeito protetor nos cães vacinados em áreas endêmicas, sendo estes resultados semelhantes aos obtidos nos trabalhos que antecederam a aprovação do produto comercial.

Ainda em relação à vacina Leishmune®, chamam a atenção os trabalhos publicados que demonstraram a capacidade da vacina em bloquear a transmissão e a sua habilidade para inibir formas promastigotas de *L. donovani* e *L. infantum* de se ligarem no sistema digestório das fêmeas dos flebotomíneos. Este estudo demonstrou o potencial do produto em bloquear a transmissão do agente e abriu nova perspectiva para o controle da LVC, podendo, inclusive, alcançar algum impacto na transmissão da LVC. O MS aguarda os resultados de um ensaio vacinal que possa esclarecer os seguintes pontos: suscetibilidade à infecção dos cães vacinados, a capacidade do cão vacinado para infectar o vetor *L. longipalpis* e o efeito da vacina sobre a capacidade dos cães previamente infectados permanecerem como reservatórios (PALATINIK DE SOUZA et al, 1994).

### **1.1.12 CONTROLE E PROFILAXIA**

As principais medidas de controle recomendadas são uso de inseticidas no controle do vetor, uso de proteção individual (telar portas, janelas, uso de mosquiteiros, roupas compridas para evitar a picada do vetor e repelentes) além do uso de inseticidas que atuem contra o vetor nos animais de estimação em áreas endêmicas (JESUS; ARAÚJO, 2007).

Todos os esforços para controlar a leishmaniose na população canina em áreas endêmicas devem ser mobilizados. A exterminação de cães soropositivos nem sempre é a medida mais eficiente, além de ser o método de controle muitas vezes inaceitável para os proprietários, muitas vezes cães sintomáticos, apresentam-se soronegativos, além de não serem a única fonte de infecção da doença. Entretanto, os métodos disponíveis para teste diagnóstico não identificam animais eliminados. (LITTLE, 2006).

Outra forma importante de controle é o combate aos mosquitos vetores na leishmaniose visceral. O uso de 'spray' inseticida utilizado dentro e fora de canis pode reduzir o risco de infecção. Medidas para proteger individualmente cães incluem manter o animal dentro de casa uma hora antes do pôr do sol e uma hora depois do alvorecer durante a época de aparecimento do vetor e a instalação de proteção de telas para manter os mosquitos fora do canil. Inseticidas tópicos na forma de repelente para proteger os cães contra picada dos mosquitos incluem: soluções, spot-on (a base de imidaclopride e permetrina), sprays (a base de permetrina e piroxifeno) e colares (impregnados de deltametrina). Além da vacinação contra leishmaniose em cães soronegativos de regiões endêmicas (LITTLE, 2006).

### **1.1.13 CONCLUSÃO**

Mesmo dispondo de mecanismos tecnológicos avançados, ainda não existe um método diagnóstico simples, barato e tratamento com eficiência comprovada que possibilite a cura dos animais positivos e/ou doentes clinicamente. Os métodos de

tratamento atuais promovem redução dos sinais clínicos e um aumento da sobrevivência destes animais. Como esta é uma zoonose de extrema importância no Brasil, os cães soropositivos/portadores devem ser submetidos obrigatoriamente a eutanásia de acordo com o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Visceral Grave. Esta informação está contida nas normas e condutas do Ministério da Saúde que visam regulamentar as ações de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral no país. Esta estratégia é adotada na Espanha, Itália, França e Portugal que apresentam taxas semelhantes da doença, entretanto ocorre que 50 a 60% dos cães positivos são assintomáticos dificultando seu diagnóstico clínico e a notificação aos órgãos oficiais.

O controle da leishmaniose tegumentar e visceral deve ser abordado de maneira abrangente sob cinco aspectos: vigilância epidemiológica, medidas de atuação na cadeia de transmissão, medidas educativas, medidas administrativas e vacina eficiente operacional. Desta forma, novas formas de diagnóstico de rotina são prioritárias e fundamentais, sendo que somente com estes dados será permitido diagnosticar se o cão está parasitado eficientemente, propondo assim medidas de vigilância ativa e de prevenção e controle mais diligentes, promovendo uma melhoria na condição da saúde pública e dos animais.

## REFERÊNCIAS

ANDREOLI, T. E. et al.. Anemias hemolíticas. In: \_\_\_\_\_. **Cecil medicina interna básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 308-312.

ANDREOLI, T. E. et al. Distúrbios dos linfócitos. In: \_\_\_\_\_. **Cecil medicina interna básica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 354-355.

AZADEH, B. Localized leishmania lymphadenitis. Immunohistochemical studies. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v.102, n. 1, p.11-15, 1994.

BANETH, G.; SHAW, S.E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 106, p. 315-324, 2002.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.

BAVIA, M. E.; CARNEIRO, D. D.; GURGEL, H. C.; MADUREIRA FILHO C.; BARBOSA, M. G. Remote sensing and geographic information systems and risk of American visceral leishmaniasis in Bahia, Brazil. **Parasitology**, Cambridge, v. 47, p. 165-169, 2005.

BENJAMIM, C. F. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. In: **Simpósio Medicina Intensiva**, v. 34, p. 18-26, 2001.

BEUTLER, B.; KROCHIN, N.; MILSARK, I, W. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. **Science**, Washington, D.C., v. 232, p. 977-980, 1986.

BEVILACQUA, F. et al. Anemias. In: \_\_\_\_\_. **Fisiopatologia clínica**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 1998. p. 489.

CAMARGO, J. B.; TRONCARELLI, M. Z.; RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 12, n. 71, p.86-92, 2007.

CASTRO, E. A.; LUZ, E.; TELLES, F. Q.; PANDEY, A.; BISETO, A.; DINAISKI, M.; SBALQUEIRO, I.; SOCCOL, V. T. Eco-epidemiological survey of Leishmania (Viannia) braziliensis American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Parana State, Brazil. **Acta Tropica**, Shannon, v. 93, p. 141-49, 2005.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido Nítrico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 17, n. 6, 2002.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected with L. infantum. **Veterinary Record**, London, v. 141, p. 539-543, 1997.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. Leishmaniose Visceral Americana (Calazar Americano ou Neotropical). In: \_\_\_\_\_. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 65-80.

CURI, N.H. A. de.; MIRANDA, I.; TALAMONI, S.A. Serologic evidence of Leishmania infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 1, p. 1-5 2006.

CUTOLO, A. A.; VON ZUBE, C. J.; LUVIZOTTO, M. C. R.; ROCHA, N. S.; LANGONI, H. Casos de Leishmaniose canina e flebotomídeos de área urbana e peri-urbana do município de Rio Claro, São Paulo, Brasil. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14., 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, 2006. p. 315.

DESJEUX, P. Leishmaniasis., **Annals of tropical medicine and parasitology**, London, v. 97, p. 3-15, 2003.

DOSSI, A. C. S.; CORREA, A. P. F. L.; VASCONCELOS, R. O.; MUNARI, D. P.; LIMA, V. M. F. Produção de IgG anti-Leishmania e perfil de citocinas em cães machos e fêmeas assintomáticos naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14., 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, 2006. p. 321.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. D. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio Janeiro, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil) **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 28, p. 36-44, 2000.

FEITOSA, M. M. Leishmaniose visceral: facetas da doença. In: CONGRESSO PAULISTA DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 6., 2006, São Paulo. **Anais...** São Paulo: ANCLIVEPA, 2006. p. 57-58.

FERRER, L. Leishmaniasis update in diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Record**, London, v. 136, n.3, p. 514-516, 1997.

FISCHER, E.; MARANO, M. A.; BARBER, A. E.; HUDSON, A.; LEE, K.; ROCK, C. S.; HAWES, A. S.; THOMPSON, R. C.; HAYES, T. J.; Comparison between effects of interleukin-1 alpha administration and sublethal endotoxemia in primates. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 261, p. 442-452, 1991.



GARCIA-ALONSO, M.; BLANCO, A.; REINA, D. et al. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 18, p. 617-623, 1996.

GARCIA, F. A. I.; MARCONDES, M.; Métodos de diagnostic da Leismaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 12, n. 71, p. 34- 39, 2007.

GRIESMAN, E. G. Experimental gram-negative bacterial sepsis: optimal methylprednisolone requirements for prevention of mortality not preventable by antibiotics alone. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 170, p. 436-42, 1982.

HARRISON, T. R. Aumento de volume dos gânglios linfáticos e do baço. In: \_\_\_\_\_. **Medicina Interna**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1962. p. 255-261.

INIESTA, L.; FERNANDEZ-BARREDO, S.; BULLE, B. et al. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, D.C., v. 9, p. 1137-1141, 2002.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, II INFORME TÉCNICO: Leishmaniose visceral americana. **Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo**, ed. MS, p.13-14, 2003.

ISHIZAKI, M. S.; AMARANTE, A. F. T.; SAVANI, E. S. M. M.; BONELLO, F. L.; TÁPARO, C. V.; SERRANO, A. C. M.; AURIA, S. R. N.; UESUGUI, M. G.; CAMARGO, M. C. G. O.; PERRI, S. H. V.; BRESCIANI, K. D. S. Estudo comparativo da sorologia e “imprint” de linfonodos em cães encaminhados ao Centro de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba, SP. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 1., 2006, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2006. p. 62.

JESUS, J. R. de ; ARAÚJO, F. A. P. de. Leishmaniose tegumentar americana: uma visão da epidemiologia da doença na Região Sul. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 12, n. 71, p. 82-84, 2007.

KASS, E. H.; FINLAND, M. Corticosteroids and infections. **Advanced Internal Medical**, v. 16, p. 422-430, 1958.

KRIEGLER, M.; PEREZ, C.; DEFAY, K.; ALBERT, I.; LU, S. D. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. **Cell**, Cambridge, v. 53, p. 45-53, 1988.

KOUTINAS, A. F.; POLIZOPOULOU, Z. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; et al. Clinical consideration on canine leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v. 35, p. 376-383, 1999.

LAMOTHE, J. Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, London, v. 42, p. 170-175, 2001.

LANGONI, H.; MACHADO, J. G.; TRONCARELLI, M. Z.; WILKE, V.; HOFFMANN, J. L.; CAMARGO, L. B.; FACCIOLI, P. Y.; SILVA, R. C. Aspectos epidemiológicos na Leishmaniose canina. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 1., 2006, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2006. p. 63-65.

LESTER, S. J.; KENYON, J. E. Use of allopurinol to treat visceral leishmaniosis in a dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 209, p. 615-617, 1996.

LIBERT, C.; BROUCKAERT, P.; SHAW, A.; FIERS, W. Induction of interleukin 6 by human and murine recombinant interleukin-1 in mice. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 20, p. 691-694, 1990.

LIMA, V. M. F.; VASCONCELOS, R. O.; ZANETTE, M. F.; IKEDA, F. A.; FEITOSA, M. M.; GOTO, H. Resposta imunológica celular e humoral à vacina Leishmune® em cães de área endêmica de Leishmaniose visceral. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14., 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, 2006. p. 321.

LIMA, V. M. F.; PEIRO, J. R.; VASCONCELOS, R. O. IL-6 é produzida em cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14., 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, 2006. p. 322.

LITTLE, S. E. Protozoal Diseases. Leishmaniasis. In GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3<sup>th</sup> ed. St. Louis: Saunders, 2006. p. 685-698.

LUVIZOTTO, M. C. R. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. **Manual Técnico Leishmaniose Visceral Canina**. Fort Dodge. p. 28-29, 2006a.

LUVIZOTTO, M. C. R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 1., 2006, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2006b. p. 13-21.

MARKS, J. D.; MARKS, C. B.; LUCE, J. M. Plasma tumor necrosis factor in patients with septic shock. **American Review of Respiratory Disease**, New York, v. 141, p. 94-97, 1990.

MONTEIRO, P. S.; LACERDA, M. M.; ARIAS, J. R. Controle da Leishmaniose no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 27, p. 67-72, 1994.

NEVES, D. P. Leishmaniose Visceral Americana. In: \_\_\_\_\_. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 67-83.

NUNES, C. M.; DIAS, A. K. K.; GOTTARDI, F. P.; PAULA, H. B.; AZEVEDO, M. A. A.; LIMA, V. M. F.; GARCIA, J. F. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da Leishmaniose visceral em sangue de cães. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14., 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, 2006. p. 330.

PALATNIK DE SOUZA, C. B.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; GOMES, E. M.; BOROJEVIC, R. Experimental murine *Leishmania donovani* infection immunoprotection by the Fucose Mannose Ligand (FML). **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 27, p. 547-551, 1994.

PENA, M. T.; ROURA, X.; DAVIDSON, M. G. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 3, p. 35-41, 2000.

PESSÔA, S. B.; MARTINS, A. V. Leishmaniose Visceral ou Calazar. In: \_\_\_\_\_. **Parasitologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p.104-124.

QUEIROZ, N. M. G. P.; SILVEIRA, R. C. V.; PAULAN, S. C.; TENORIO, M. S.; TASCA, K. I.; LIMA, F. L.; STARKE-BUZETTI, W. A.; NEVES, M. F.; NORONHA Jr, A. C. F.; MACHADO, R. Z.; OLIVEIRA, T. M.; OLIVEIRA, F. P. Exame parasitológico e histopatológico realizados em peles de cães infectados com Leishmaniose visceral canina em Ilha Solteira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14., 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, 2006. p. 319.

REY, L. O *Complexo "Leishmania donovani"* e a *Leishmaníase Visceral*. In: \_\_\_\_\_. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 253-265, 2001a.

REY, L. *Leishmania e leishmaníases: Os parasitos*; In: \_\_\_\_\_, **Parasitologia**. 3 ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, p. 214 – 226, 2001b.

RIBEIRO, R. R.; SILVA, M. E.; SAMPAIO, W. M.; PIMENTEL, V. M.; FULGÊNCIO, G. O.; SILVA, S. M.; OLIVEIRA, E. L.; VIANA, M. H.; MUNIZ, L. G.; GENNARI, S. M.; MICHALIK, M. S. M. Prevalência de anticorpos anti-Leishmania em cães (*Canis familiaris*) de Belo Horizonte, Minas gerais, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14., 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, 2006. p. 317.

RIBEIRO, R. R.; MOURA, E. P.; SCHETTINI, D. A.; SAMPAIO, W. M.; FULGÊNCIO, G. O.; PIMENTEL, V. M.; ALVES, C. F.; MELO, F. A.; ARRUDA, F. C. S.; SILVA, S. M.; TAFURI, W. L.; MELO, M. N. FREZARD, F.; MICHALIK, M. S. M. Redução da carga parasitária de cães naturalmente infectados com Leishmania (*Leishmania*) chagasi após tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14., 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, 2006. p. 318.

ROITT, I. M. Different CD4 T-cell subsets can make different cytokines patterns. THE ESSENTIAL immunology. 9<sup>th</sup> ed. London, 1997. p. 184-200.

SANTOS, G. P dos.; SANAVRIA, A.; MARZOCHI, M. C.; DOS SANTOS, E. G.; SILVA, V. L.; PACHECO, R. S.; MOUTA-CONFORT, E.; ESPINDOLA, C. B.; SOUZA, M. B. de; PONTE, C. S.; CONCEIÇÃO, N. F.; DE ANDRADE, M. V. Prevalence of canine infection from endemic areas of American cutaneous Leishmaniasis in Paracambi district, Rio de Janeiro state, between 1992 and 1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 38, p. 161-165, 2005.

SCHADE, U. F. Pentoxifylline increases survival in murine endotoxin shock and decreases formation of tumor necrosis factor. **Circulatory Shock**, New York, v. 31, p. 171-81, 1990.

SILVA, A. V. M.; PAULA, A. A. de.; CABRERA, M. A. A.; CARREIRA, J. C. A. Leishmaniasis in domestic dogs: epidemiological aspects. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, 2005.

SILVEIRA, R. C. V.; QUEIROZ, N. M. G. P.; TASCA, K. I.; PAULAN, S. C.; STARKE-BUZETTI, W. A.; NEVES, M. F.; DE NORONHA Jr, A. C. F.; TENORIO, M. S.; LIMA, F. L.; MACHADO, R. Z.; OLIVEIRA, T. M.; OLIVEIRA, F. P. Exames parasitológicos e histopatológico realizados em fígado de cães infectados com Leishmaniose visceral canina em Ilha Solteira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14., 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, 2006. p. 318.

SLAPPENDEL, R. J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases. **Veterinary Quarterly**, Utrecht, v. 10, p. 1-16, 1988.

SLAPPENDEL, R. J.; TESKE, E. The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimonate (Glucantime) in dogs with leishmaniasis. A randomized clinical trial. **Veterinary Quarterly**, Utrecht, v. 19, p. 10-13, 1997.

VELASQUEZ, L. G.; NORBERTO, M.; MEMBRIVE, U.; RODRIGUES, G.; REIS, N.; LONARDONI, M. V. C.; TEODORO, U.; TESSMANN, I. P. B.; SILVEIRA, T. G. V. PCR in the investigation of canine American tegumentary leishmaniasis in northwestern Paraná State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, 2006.

ZANZARINI, P. D.; SANTOS, D. R.; SANTOS, A. R.; OLIVEIRA, O.; POIANI, L. P.; LONARDONI, M. V. C.; TEODORO, U.; SILVEIRA, T. G. V. Leishmaniose tegumentar americana canina em municípios do norte do Estado do Paraná, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 6, 2005.

## **VIGILÂNCIA ATIVA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS – PR**

### **RESUMO**

A leishmaniose é uma das principais parasitoses re-emergentes no Brasil e no mundo. No estado do Paraná a enfermidade ocorre em regiões endêmicas como o Vale do Ribeira com sérios problemas para a saúde pública. O controle da leishmaniose depende da viabilidade e especificidade de métodos diagnósticos. O objetivo deste trabalho foi determinar a soroprevalência da leishmaniose em cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses do município de São José dos Pinhais, PR. Ao conhecer a situação desta zoonose em uma população randomizada de cães oriundos de vários bairros deste município, área não endêmica, será possível identificar a ocorrência nesta região. Comparou-se, o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e a Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) para Leishmaniose em cães com o objetivo de verificar o nível de anticorpos contra *Leishmania sp* nos soros de cães que habitam o município de São José dos Pinhais. Das 364 amostras de sangue de cães colhidos durante o período de fevereiro de 2006 a julho de 2007 somente uma amostra (0,0027%), de um cão macho, porte grande, adulto, sem raça definida, sororeagente no ELISA e nenhuma amostra teve resultado positivo para a RIFI. Foi também realizado imprint de linfonodo poplíteo de 50 cães para possível detecção de formas amastigotas de *Leishmania sp*, onde não foi encontrado nenhum cão positivo.

Palavras-chave: Leishmania, Cão, ELISA, RIFI, São José dos Pinhais-PR

## ABSTRACT

Leishmaniosis is one of the principal re-emergent parasitosis in Brasil and in the world. In the Paraná State, leishmaniosis exist in endemic regions like Vale do Ribeira with serious problems to public health. The control of the leishmaniosis depend on the viability and specificity of diagnostic methods. The aim of this work was to determine the soroprevalency of leishmaniosis in dogs from the Control Center of Zoonosis of São José dos Pinhais city, Paraná State. The knowledge of this zoonosis situation in a random population of dogs from the various district of this city, non endemic area, shall be possible to identify focus of dissemination in this region. Imunoenzyme Assay (ELISA) and Indirect Immunofluorescence Reaction (RIFI) were compared to detect dogs Leishmaniosis to verify the antibody level against *Leishmania sp* on the dogs serum that lives in the São José dos Pinhais city. From the 364 blood samples collected during the period of february 2006 to July 2007, only one sample (0,0027%), male, mongrel dog, adult, large breed was serum reagent for ELISA and no sample had positive result to the RIFI analysis. Imprints of popliteal lymphnode from 50 dogs also were analysed to detect the amastigote forms of *Leishmania sp*, and no dog were found positive.

Key words: *Leishmania sp*, Dog, ELISA, RIFI, São José dos Pinhais -PR



## 2.1 INTRODUÇÃO

Entre 1985 e 1999, foram registrados 388.155 casos autóctones de Leishmaniose no Brasil, isto significa evidente expansão demográfica da doença. Atualmente, a média de notificação é de 30.000 casos anuais em todo território nacional (JESUS; ARAÚJO, 2007).

Casos de Leishmaniose canina e flebotomídeos de área urbana e peri-urbana do município de Rio Claro, São Paulo (CUTOLO et al., 2006), assim como relatados por Curi et al. (2006) onde evidenciaram infecção em cães domésticos e selvagens nos arredores do Parque Nacional no Rio de Janeiro, chamam a atenção para o aumento de casos em todas as regiões do país. Em estudo realizado por Ribeiro et al. (2006a) para determinar a prevalência de anticorpos anti-leishmania em cães da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, concluiu-se que do total de 511 soros analisados, 134 foram positivos para Leishmania, representando uma prevalência de 26,22%.

Na região Sul o destaque é o Paraná, responsável por 98% dos casos de Leishmaniose tegumentar americana na região, onde demonstrou aumento gradativo no número de municípios com registros de casos, passando de 117 em 1994 para 146 em 1998. O Vale do Ribeira considerada região endêmica da doença no Paraná, apresenta sérios problemas para a saúde pública. (CASTRO et al., 2005.; JESUS; ARAÚJO, 2007.; ZANZARINI et al.; 2005).

Dunaiski. (2006) realizou estudo epidemiológico da Leishmaniose tegumentar americana em três cidades na região do Vale do Ribeira, Municípios de Adrianópolis, Cerro Azul e Rio Branco do Sul as quais se situam a sudeste do Estado do Paraná e o último faz parte da região metropolitana de Curitiba. O percentual de animais sororeagentes foi de 14% no município de Adrianópolis, 14,28% em Cerro Azul e 16,85% em Rio Branco do Sul. Quarenta e cinco cães examinados apresentaram sorologia positiva quando submetidos ao antígeno de Leishmania braziliensis usando a técnica de Ensaio Imunoenzimático (ELISA).

Ishizaki et al, (2006) realizaram estudo comparativo da sorologia e “imprint” de linfonodos em cães encaminhados ao Centro de Controle de Zoonoses do

município de Araçatuba, SP e demonstrou-se discordância de sensibilidade e especificidade na detecção de infecção por *Leishmania sp.* em cães, quando as técnicas foram comparadas.

Métodos diagnósticos acessíveis como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e aspirado de linfonodo poplíteo têm demonstrado eficiência para o controle preventivo da doença. A RIFI também pode ser utilizada para detecção de anticorpos direcionados contra antígenos já conhecidos a estar presente em dado tecido ou preparação celular. A fluoresceína é acoplada com o anticorpo sem destruir sua especificidade, o conjugado combina com antígeno presente na amostra tecidual é visualizado na microscopia fluorescente, desta maneira a distribuição do antígeno ao redor do tecido e com células pode ser demonstrada (LUVIZOTTO, 2006).

Dentre os métodos sorológicos, a RIFI, vem sendo utilizada a partir da década de 60 e é o mais utilizado, pois vem demonstrando sensibilidade de 90 a 100% e especificidade aproximada de 80% para amostras de soro. É uma técnica sensível, porém com possibilidade de reações cruzadas especialmente com a doença de Chagas. A RIFI apresenta resultados variáveis na Leishmaniose cutânea, quer pela reduzida antigenicidade do parasita ou pelos baixos níveis de anticorpos circulantes. Habitualmente negativa na forma cutânea difusa, sua sensibilidade foi estimada em 71% nas formas cutâneas e 100% na forma mucosa. Em pacientes com lesões recentes (um a seis meses de evolução), é freqüente a negatividade sorológica (CASTRO et al., 2005).

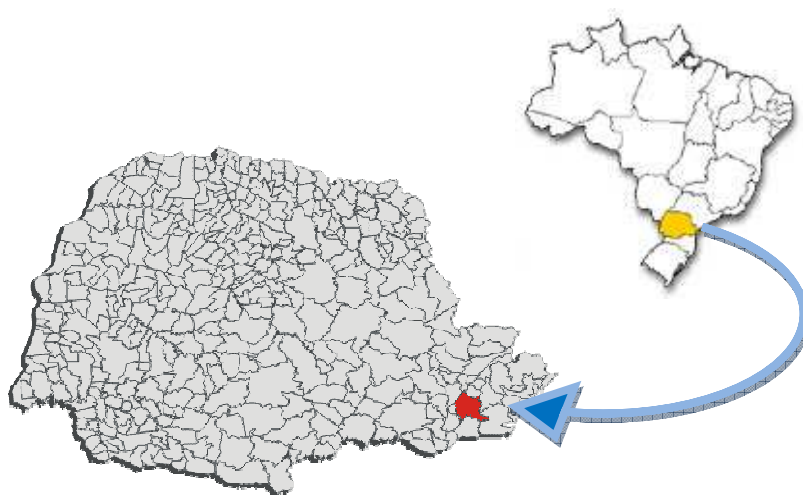
Com o propósito de determinar a soroprevalência da Leishmaniose em cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do Município de São José dos Pinhais, PR, este estudo comparou duas formas de diagnóstico ELISA e RIFI para Leishmaniose em cães com o intuito de elucidar a incidência da doença na população de cães e identificar possível foco de disseminação nesta região para monitoramento da doença.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Município de São José dos Pinhais que situa-se ao leste do Estado do Paraná na região Metropolitana de Curitiba (Figura 1). Possui uma área de 946 km<sup>2</sup>, população 263.622 habitantes, possui uma densidade demográfica de 276,1 hab/km<sup>2</sup> e uma altitude de 906 metros. Apresenta clima subtropical úmido, com temperatura média anual de 16 °C. Localiza-se a uma latitude 25°32'05" sul e a uma longitude 49°12'23" oeste. Situa-se um pouco abaixo do Trópico de Capricórnio. Limita-se ao norte com os municípios de Curitiba, Pinhais e Piraquara, ao sul com Mandirituba e Tijucas do Sul, ao Leste com Morretes e Guaratuba e a Oeste com Fazenda Rio Grande (IBGE, 2007).

FIGURA 1 - MAPA DO ESTADO DO PARANÁ, COM DESTAQUE PARA O MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS – PR



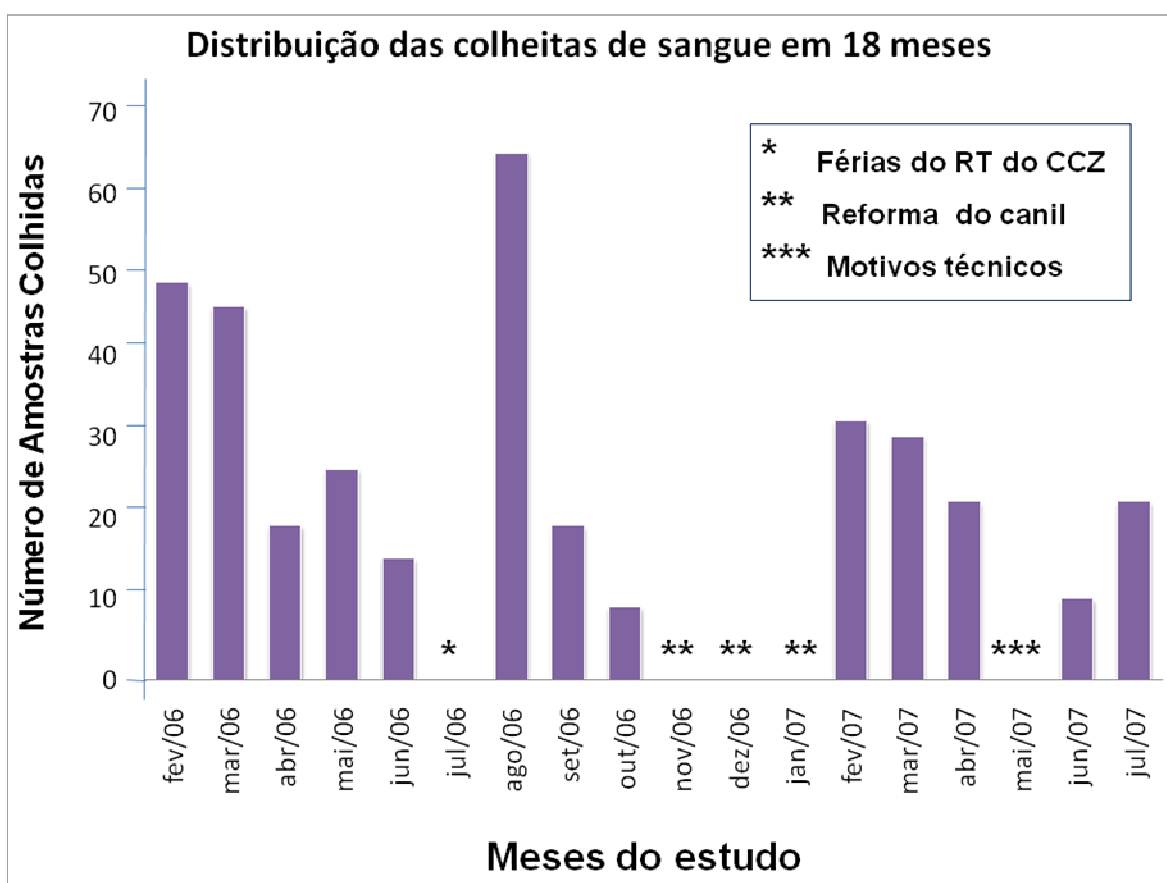
Fonte: <http://images.google.com.br/imgres?imgurl=http://perfildomunicipio.caged.com.br/pr/mapa>

### 2.2.2 Amostras e exames

O estudo foi realizado no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), do Município de São José dos Pinhais – PR, obtendo a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (CEUA/UFPR, 2006) (ANEXO 1).

Foram avaliados clinicamente e colhidas 364 amostras de sangue de cães provenientes do CCZ do Município de São José dos Pinhais, Paraná, no período de Fevereiro de 2006 a Julho de 2007. O número de colheitas a cada mês foi semelhante, onde tem-se amostras colhidas em todas as estações do ano (Figura 2)

FIGURA 2. DISTRIBUIÇÃO DAS COLHEITAS DE SANGUE EM 18 MESES.



As colheitas foram realizadas por punção intracardíaca em pacientes previamente contidos fisicamente e posteriormente anestesiados com cloridrato de

cetamina<sup>1</sup> 10 mg/kg e Xilazina<sup>2</sup> na dose de 1 mg/kg respectivamente por via intramuscular. Após este procedimento foi administrado tiopental na dose de 12,5 mg/kg por via intravenosa. Cada cão foi cadastrado contendo dados como: data da colheita, número do animal, sexo, porte, idade, raça, bairro proveniente e situação domiciliar.

Após as colheitas, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 3000 rpm em seguida aliquoteadas e armazenadas em Eppendorf de 1,5ml e congeladas a -18° C.

Também, além da colheita de sangue, foram realizadas extirpação de linfonodos poplíteos de 50 cães. Os mesmos foram excisados longitudinalmente e pré secados com papel toalha, posteriormente realizados imprint em lâmina de vidro, 3 lâminas de cada amostra. Quinze lâminas de diferentes pacientes foram coradas pelo método Romanowski logo após o imprint em lâmina e as demais coradas somente antes da leitura em microscópio, meses depois.

Foram realizadas duas formas de diagnóstico laboratorial para leishmaniose nas amostras de soro de cães: ensaio Imunoenzimático (ELISA) (ANEXO 2) para pesquisa de anticorpos contra *Leishmania* e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (ANEXO 3).

As amostras foram processadas na FMVZ, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus Botucatu – SP, Laboratório de Zoonoses.

---

<sup>1</sup> Cetamin<sup>®</sup>: Syntec

<sup>2</sup> Rompun<sup>®</sup>: Bayer

### 2.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O dimensionamento das amostras foi analisado conforme a fórmula a seguir de acordo com MARQUES e MARQUES, (2005):

$$n = \frac{Z_c^2 \times p \times (1 - p) \times N}{e^2 \times (N - 1) + Z_c^2 \times p \times (1 - p)}$$

$Z_c = 1,96$  (valor fixo) da tabela de distribuição normal com nível de confiança de 95%

$p = 0,10$  (10%)

$N = 62.500$  (número de cães de São José dos Pinhais)

$e = 0,031$  (3,1%) erro amostral

$n \cong 364$  animais

### 2.2.4 RESULTADOS

Das 364 amostras colhidas e processadas nas duas formas de diagnóstico sorológico citadas acima, somente uma amostra (0,0027%) foi soro reagente no Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e nenhuma amostra demonstrou resultado positivo para a (RIFI). Já no exame Imprint de linfonodo poplípeo em lâminas de vidro, não foram encontradas formas amastigotas de leishmania.

Na tabela 4 estão descritas as características da população amostrada.

**TABELA 4** – DISTRIBUIÇÃO DOS CÃES ESTUDADOS ORIUNDOS DO CCZ DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS - PR, NO PERÍODO DE FEVEREIRO DE 2006 A JULHO DE 2007, DE ACORDO COM SEXO, PORTE, IDADE, RAÇA, SITUAÇÃO DOMICILIAR.

<b>CATEGORIA</b>	<b>POPULAÇÃO ESTUDADA</b>	<b>NÚMERO</b>	<b>%</b>
<b>SEXO</b>	Machos	218	59,89
	Fêmeas	146	40,11
<b>PORTE</b>	Grande	157	43,13
	Médio	135	37,09
	Pequeno	72	19,78
<b>IDADE</b>	Filhote	23	6,32
	Adulto	327	89,84
	Idoso	14	3,84
<b>RAÇA</b>	Raça definida	134	36,81
	Sem Raça Definida	230	63,19
<b>SITUAÇÃO DOMICILIAR</b>	Domiciliados	142	39,01
	Não Domiciliados	222	60,99

Como amostra positiva no ELISA o cão de número de identificação 303, colhido na data de 07 de março de 2007, foi de cão macho, porte grande, adulto, sem raça definida, proveniente do Bairro Afonso Pena, não domiciliado.

### 2.2.5 DISCUSSÃO

O estudo de soroprevalência e diferentes formas de diagnóstico para Leishmaniose no município de São José dos Pinhais, Paraná, demonstrou que no município foram encontrados cães com sinais clínicos de alopecia, anorexia, linfadenomegalia, porém uma amostra de cão assintomático colhido no período de verão teve sorologia positiva.

Segundo Falqueto et al., (1996) e descrições de Oliveira Neto et al., (1988) existe a possibilidade de correlação entre a presença de cães infectados e novos casos humanos em regiões endêmicas, pois as infecções dos cães precedem a aparição de casos humanos, onde o cão é um dos principais reservatórios da doença (DESJEUX, 2003; MONTEIRO et al., 1994).

Nela resultados obtidos na distribuição dos cães estudados oriundos do CCZ de São José dos Pinhais - PR, no período de Fevereiro de 2006 a Julho de 2007, constatou-se que os cães de grande porte recolhidos pelo CCZ predominaram em 43%. Por serem cães maiores, vivem fora e/ou dormem fora de suas residências, muitas vezes são agressivos e são abandonados. Conseqüentemente são alvos dos mosquitos que têm hábitos noturnos. Os cães adultos e idosos, independentemente da idade podem ser reservatórios. Cães sem raça definida são a maioria, e a quantidade de cães não domiciliados (61%) indicam que a existência de uma população canina que merece atenção de risco de saúde pública, na existência da possibilidade de correlação entre a presença de cães infectados e casos humanos.

De acordo com Ferrer, (1999) e Gradoni, (2002), o método diagnóstico ideal para Leishmaniose canina deve ser de baixo custo, rápido e mostrar alta sensibilidade e especificidade.

Com a finalidade de aperfeiçoar o diagnóstico de Leishmaniose canina em área endêmica da região noroeste de São Paulo, e testar a eficácia de método parasitológico, imunológico e molecular, levaram Moreira et al., (2007) a estudarem a detecção do parasita pelo Hematoxilina & Eosina (HE) e imunoistoquímica os quais foram especificamente mais efetivos em linfonodos, quando comparado com outros órgãos. ELISA demonstrou alta sensibilidade em comparação com a RIFI. Com respeito ao diagnóstico com base na etiologia da doença, a detecção direta do



parasita pela coloração HE de amostras parafinadas foi mais efetiva em linfonodos poplíteos seguido de baço e medula óssea. (MOREIRA et al., 2007).

Também, de acordo com Moreira et al., (2007), tendo estabelecido que a identificação pela HE ou imunoistoquímica de tecidos seccionados e embebidos em parafina são as amostras mais apropriadas para esclarecer o diagnóstico com base na etiologia da Leishmaniose canina, entre os órgãos testados, os aspirados de linfonodos poplíteos de cães naturalmente infectados são utilizados como sinal para testar metodologias adicionais, estudados com o objetivo de facilitar e acelerar o diagnóstico da doença. Com esta finalidade, ao adequar este teste rápido a campo no Centro de Controle de Zoonoses, o imprint de linfonodos logo após a submissão do cão a eutanásia não foi conclusivo para método diagnóstico.

A comparação da performance diagnóstica da avaliação citológica, imunofluorescência, imonocitoquímica e PCR aplicada em aspirado de linfonodo mostrou que a detecção do parasita pelo exame direto citológico, apesar de ser rápida, não requerer equipamento sofisticado e apresenta baixa sensibilidade (MOREIRA et al, 2007).

## **2.2.5 CONCLUSÃO**

Os resultados deste estudo permitem concluir que a soroprevalência da leishmaniose no Município de São José dos Pinhais, PR é baixíssima. A distribuição desta doença em uma população de cães e os fatores que determinam esta distribuição, são observações primordiais para um levantamento epidemiológico desta doença nesta região. Desvendar tais indícios por meio de métodos diagnósticos eficazes é importante para esclarecer a etiologia, identificar grupos de risco e controlar e aplicar medidas preventivas apropriadas.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os cães desempenham um papel importante como modelo animal de estudo na leishmaniose cutânea e visceral, em função da susceptibilidade da espécie ao parasito, da resposta orgânica frente ao patógeno e principalmente pelo relevante risco a saúde pública, devido a sua proximidade com o homem.

O presente estudo relata a primeira pesquisa de soroprevalência da leishmaniose em cães na região de São José dos Pinhais, PR. Entretanto nesta pesquisa inédita constatou-se baixíssima soroprevalência da doença na região. As amostras foram colhidas durante 18 meses e neste contexto as variáveis climáticas foram correlacionadas, pois os dados acompanharam às quatro estações do ano, levando em consideração as mudanças climáticas como temperatura, umidade relativa do ar e precipitação que são fatores que contribuem para que o vetor atravesse as barreiras naturais para novas regiões carreando o agente.

A metodologia clássica para diagnóstico de Leishmaniose inclui: diagnóstico clínico, parasitológico, sorológico, molecular, imunológico, além de cultivo parasitológico, inoculação experimental e xenodiagnóstico. Em áreas endêmicas, testes sorológicos são usados para diagnóstico e também como ferramenta em estudos epidemiológicos sendo que as técnicas mais utilizadas são: imunofluorescência indireta e ELISA. O Método com maior sensibilidade é a PCR que também pode ser usado. Todas estas formas de diagnóstico não reúnem isoladamente todas as características consideradas desejáveis como: fácil execução, custo acessível, rapidez e a alta especificidade e sensibilidade.

O aprimoramento dos métodos diagnósticos, os estudos soro-epidemiológicos regionais, o controle sistemático de vetores, o uso de inseticidas de ambiente e coleiras, a adoção da eutanásia de cães positivos além da busca de antimicrobianos e um tratamento efetivo são exemplos de medidas de controle da enfermidade.

Propõe-se que as ações de controle e profilaxia da doença sejam mais voltadas a evitar mudanças bruscas em ecossistemas estáveis ou qualquer fator que favoreça um aumento na densidade do vetor. A população deve adotar medidas

profiláticas simples, retirando fontes de alimentos ou de criadouros do vetor no peridomicílio.

A complexidade do agente causal e adaptabilidade dos vetores aos ecossistemas dificultam as estratégias de controle e profilaxia. A adoção sistemática e simultânea nos diversos elos da cadeia epidemiológica faz com que se tenham perspectivas de controle efetivo da doença nos animais e no homem.

## REFERÊNCIAS

- CASTRO, E. A.; LUZ, E.; TELLES, F. Q.; PANDEY, A.; BISETO, A.; DINAISKI, M.; SBALQUEIRO, I.; SOCCOL, V. T. Eco-epidemiological survey of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Parana State, Brazil. **Acta Tropica**, Shannon, v. 93, p. 141-49, 2005.
- CURI, N.H. A. de.; MIRANDA, I.; TALAMONI, S.A. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, nº1, p. 1-5, 2006.
- CUTOLO, A. A.; VON ZUBE, C. J.; LUVIZOTTO, M. C. R.; ROCHA, N. S.; LANGONI, H. Casos de Leishmaniose canina e flebotomídeos de área urbana e peri-urbana do município de Rio Claro, São Paulo, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14., 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, 2006. p. 315.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis. **Journal of the Annals of Tropical Medicine Parasitology**, v. 97, p. 3-15, 2003.
- DUNAISKI, M. **Epidemiologia da Leishmaniose tegumentar americana na região do Vale do Ribeira – Paraná: cães reservatórios ou hospedeiros acidentais?** 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- FALQUETO, A.; COURA, J.; BARROS, C.; GRIMALDI, G.; SESSA, P.; CARIAS, V. et al. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado do Espírito Santo. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 81, p. 155-163, 1986.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. Canine leishmaniasis: an update. In: PROCEEDING OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999. **Anais...** Barcelona, 1999. p. 6-10.

GRADONI, L.; GRAMICCIA, M.; MANCIANTI, F.; PIERI, S. Studies on leishmaniasis control. 2. Effectiveness of control measures against canine leishmaniasis in the isle of Elba, Italy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, p. 568-571, 1988.

IBGE. **São José dos Pinhais**. Disponível em: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acesso em 24/02/2008.

ISHIZAKI, M. S.; AMARANTE, A. F. T.; SAVANI, E. S. M. M.; BONELLO, F. L.; TÁPARO, C. V.; SERRANO, A. C. M.; AURIA, S. R. N.; UESUGUI, M. G.; CAMARGO, M. C. G. O.; PERRI, S. H. V.; BRESCIANI, K. D. S. Estudo comparativo da sorologia e “imprint” de linfonodos em cães encaminhados ao Centro de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba, SP. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 1., 2006, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2006. p. 62.

JESUS, J. R. de ; ARAÚJO, F. A. P. de. Leishmaniose tegumentar americana: uma visão da epidemiologia da doença na Região Sul. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 12, n. 71, p. 82-84, 2007.

LUVIZOTTO, M. C. R. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. **Manual Técnico Leishmaniose Visceral Canina**. Fort Dodge. p. 28-29, 2006.

MARQUES, J. M.; MARQUES, M. A. M. **Estatística para os cursos de engenharia**. Curitiba: Domínios do Saber, 2005. p 140.

MONTEIRO, P. S.; LACERDA, M. M.; ARIAS, J. R. Controle da Leishmaniose no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 27, p. 67-72, 1994.

MOREIRA, M. A. B.; LUVIZOTTO, M. C. R.; GARCIA, J. F.; CORBETT, C. E. P.; LAURENT, M. D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 145, p. 245-252, 2007.

OLIVEIRA-NETO, M. M.; PIRMEZ, C.; RANGEL, E.; SCHUBACH, A. et al. Na outbreak of American cutaneous leishmaniasis in a periurban area of Rio de Janeiro: clinical and epidemiological. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 83, p. 427-435, 1988.

ZANZARINI, P. D.; SANTOS, D. R.; SANTOS, A. R.; OLIVEIRA, O.; POIANI, L. P.; LONARDONI, M. V. C.; TEODORO, U.; SILVEIRA, T. G. V. Leishmaniose tegumentar americana canina em municípios do norte do Estado do Paraná, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 6, p.1-4, 2005.

## ANEXOS



**Universidade Federal do Paraná**  
**Setor de Ciências Agrárias**  
**Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA**

### CERTIFICADO


Certificamos que o protocolo no. 022/2006, referente ao projeto “Epidemiologia e eficiência de diferentes formas de diagnóstico da Leishmaniose canina em São José dos Pinhais”, sob a responsabilidade de Michele Salmon Frehse, na forma em que foi apresentado e de acordo com a resposta ao ofício no. 19/2006 CEUA-SCA, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 30 de novembro de 2006. Este certificado expira em 30 de novembro de 2007.

### CERTIFICATE

We certify that the protocol number 022/2006, regarding the project “Epidemiology and efficacy of diagnostic approach of canine leishmaniosis in Sao Jose dos Pinhais”, in charge of Michele Salmon Frehse, in the terms it was presented and according to the reply to document number 19/2006 CEUA-SCA, was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Parana, Southern Brazil) during session on November 30, 2006. This certificate expires on November 30, 2007.

Curitiba, 24 de abril de 2007

  
 Carla Forte Maiolino Molento  
 Presidente

  
 Rogério Ribas Lange  
 Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Setor de Ciências Agrárias  
 Universidade Federal do Paraná



## ANEXO 2

### Teste imunoenzimático (ELISA)

#### Preparação do antígeno (*Leishmania major*)

- Cultivar as leishmanias no meio LIT ("liver infusion tryptose") durante sete dias em uma garrafa (ROUX de 1L) que deixe a cultura com uma superfície de aeração boa para um crescimento melhor.
- Colocar 1/5 de cultura e meio , então 40ml do meio e 10 ml de cultura (repique de 7 dias do NNN/LIT, onde foi colocado 10ml de LIT e 0,5 ml do cultivo que estava no NNN/LIT).
- Colocar esta cultura num tubo de plástico (Falcon 50ml).
- Centrifugar a 3000 rpm durante 10 min para abaixar as formas e descartar o LIT (as formas ficarão depositadas no fundo).
- Acrescentar 10 ml de PBS-estéril com uma seringa de 10ml, homogeneizar (vortex), equilibrar e centrifugar novamente a 3000rpm durante 10 minutos.
- Repetir esta operação mais 2 vezes.
- Acrescentar 10 ml de PBS-estéril , homogeneizar em vórtex.
- Identificar e congelar a -20<sup>0</sup>C. Pode deixar de um dia para o outro.
- Armazenar em freezer -70 °C até sonicação.

### SONICAÇÃO

- Descongelar o material (cultura).
- Sonicar com ciclo de 50%, 4<sup>0</sup>C, 30" (6 ciclos).
- Analisar as formas (se estão todas quebradas e em pequenos fragmentos).

- Centrifugar material sonicado em centrífuga refrigerada, 5000rpm por 15 min.
- Antígeno será o sobrenadante (parte líquida).

Aplicar com pipeta vagarosamente e com cuidado para não misturar.

## **CONSERVAÇÃO DAS PROTEÍNAS**

PMSF  $C_7H_7FO_2S$  (PHENYLMETHYL SULFONYL FLUORIDE)

USB Cat 20203 CAS 329-98-6 FW 17419

- Para fazer 10ml PMSF

0,436 em 10ml de metanol ou 0,218 em 5ml de metanol

USAR:

concentração 250mM (milimolar)

$$C_1V_1=C_2V_2$$

250mM (sol mãe).  $V_1$  (o que de deve usar)= 1mM (concentração que deve ser usado) .  $V_2$  (volume que tenho de Ag)

$$V_1=2mM/ml//250mM$$

$$V_1= 0,008 \text{ ml ou } 8 \text{ ul (utilizar 8 ul de PMSF para 2ml de antígeno)}$$

DISTRIBUIR EM FRASCOS PARA CONGELAR E SEPARAR UM PARA DOSAR PROTEÍNA

## **Dosar proteína com método de Lowry (1951)**

Antígeno sempre congelado e identificado

### Protocolo Sensibilização das placas de ELISA (MUKERJI et al., 1991)

As placas de ELISA de poliestireno de fundo chato são sensibilizadas com o antígeno (*Leishmania major*) na concentração de 3 microgramas por well, mas como calculado para 100 wells, é necessário 300 microgramas de antígeno.

1ml----- y microgramas de proteína (depende da concentração do antígeno)

x-----300microgramas

$x = \dots\dots\dots\text{ml}$  ( quantidade de antígeno colocado em 10ml do tampão de ligação para sensibilizar a placa)

- ✓ As placas devem ser deixadas em câmara úmida de um dia para o outro;
- ✓ Lavar a placa 4 vezes com solução de lavagem;
- ✓ Secar a placa;
- ✓ Bloquear a placa com 150 microlitros de PBSC (tampão bloqueio) durante 1 hora na estufa a 37°C;
- ✓ Desprezar e lavar 4 vezes;
- ✓ Secar por 10 min em estufa;

Os soros devem ser diluídos em solução de “phosphate buffer saline caseína tween” (PBSC) a 1/40, utilizando 195µl de PBSC e 5µl de soro. Para que fique uma diluição de 1/80 na placa sensibilizada, são colocados 50µl de PBSC e acrescentados mais 50µl da diluição de 1/40.

Os controles positivos (dois), negativos (quatro) (mesma diluição dos soros, 1/80) e brancos (dois) (100 microlitros de PBSC) também são acrescentados às placas.

- ✓ Volume final na placa de 100 microlitros;
- ✓ Deixar na estufa a 37°C durante 30 minutos;

- ✓ Lavar 4 vezes com solução de lavagem para retirar o excesso de soro;
- ✓ Secar as placas.

O conjugado imunoenzimático usado é uma antiimunoglobulina de cão, fração IgG, e marcada com peroxidase (Sigma-Company USA). Este foi titulado com soros e conjugado já conhecidos, chegando a um título ideal de 1/1000.

Uma placa, considerar 100 well, então necessita de 100ul para cada well, perfazendo um volume total de 10000ul ou 10 ml.

- ✓  $10000/1000 = 10$  ul do conjugado em 10ml de PBSCT (para uma placa)
- ✓ São incubadas com 100µl/orifício de conjugado por 30 minutos
- ✓ Em seguida, são lavadas novamente quatro vezes com solução de lavagem.

São adicionadas às placas 100 µl/orifício da solução de substrato (5mg de -O-fenilenodiamino -OPD + 4µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% + 10ml de tampão citrato-fosfato), mantendo-as no escuro à temperatura ambiente por 10 minutos.

- ✓ São adicionados 30µl/orifício de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 4N para interromper a reação.
- ✓ As leituras das reações são feitas em leitor de ELISA a 492nm. Os resultados são expressos em valores de densidade óptica (DO).

O ponto de corte para o ELISA são determinado de acordo com o seguinte cálculo:

$$\text{Ponto de Corte} = \text{média dos controles negativos} \times 2 \times 1,2$$

### Soluções:

#### Tampão de ligação (Coatting buffer)

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,59 gramas
NaHCO <sub>3</sub>	2,93 gramas
Água destilada	1000 ml

**PBS**

NaCl	17 gramas
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,669 gramas
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> X H <sub>2</sub> O	0,257 gramas
Completar com água destilada até 2 litros, pH 7,5	

**PBSCT – ELISA**

PBS ELISA pH 7,5	1000 litros
Caseína	2,5gramas
Tween 20	0,5 ml

Filtrar com papel filtro

**PBSC (tampão bloqueio)**

PBS ELISA	1000ml
Caseína	20 gramas

Aquecer inicialmente o PBS à 90°C no microondas (medir com termômetro) dissolvendo em seguida a caseína completamente. Filtrar em papel filtro.

**SOLUÇÃO DE LAVAGEM DO ELISA**

NaCl	9 gramas
Tween 20	0,5 ml
Água destilada	1000ml

**TAMPÃO SUBSTRATO DO ELISA**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,19 gramas
Ácido cítrico x H <sub>2</sub> O	5,7 gramas
Água destilada	1000 ml

pH 5

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 normal**

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 98g

2 moles (4 N)

98-----1mol

x-----2

x = 196g

D = M/V

1,84=196/V

V = 196/1,84

## ANEXO 3

### Protocolo da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

#### Testes sorológicos:

A sorologia é o método preferencial para o diagnóstico da leishmaniose visceral e a canina, mesmo durante estágios precoces da enfermidade. Nas formas subclínicas, casos soropositivos são confirmados pela detecção do parasita. A sorologia apresenta menor valor para a leishmaniose cutânea e mucocutânea. Dentre as técnicas sorológicas disponíveis, a reação de imunofluorescência indireta e ELISA são as mais utilizadas. Utilizam-se ainda os testes de aglutinação direta, imunoeletroforese e hemaglutinação indireta.

### PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO

#### Manutenção das promastigotas:

O Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses da UNESP de Botucatu emprega como antígeno a forma promastigota da *Leishmania major*, que é mantida em tubos rosqueados contendo 10 mL de meio LIT (Liver Infusion Tryptose) (líquido) e 5 mL de meio NNN (McNeall, Novy & Nicolle) (sólido).

A repicagem para manutenção do antígeno é realizado semanalmente da seguinte maneira:

- Dentro da câmara asséptica, retira-se uma gota de cada um dos 3 tubos de manutenção mais recentes (repicar da semana anterior), colocando-se entre lâmina e lamínula para observação em microscópio óptico (aumento de 40X), para avaliação do crescimento das promastigotas;

- Do tubo que possui parasitas com melhor motilidade e em maior quantidade, repica-se uma alíquota de 0,5 mL para três novos tubos contendo NNN e LIT, procedendo-se assim uma nova passagem;
- Os tubos são mantidos em estufa a 28-30°C, temperatura ideal para o desenvolvimento das leishmanias.

### **Obtenção das promastigotas para a preparação de lâminas:**

- Para a obtenção de uma quantidade viável de promastigotas por lâmina, é necessário repicar 0,5 ml de uma cultura em LIT e NNN para um tubo de rosca contendo somente 10 ml de LIT. Deve-se proceder dois repiques em LIT, com intervalo de 7 dias para obtenção de maior concentração do agente.
- Após a verificação do crescimento das promastigotas em microscópio óptico, centrifugar 10 ml de LIT a 3000 rpm por 10 minutos;
- Em seguida, desprezar o sobrenadante e acrescentar de 2 a 3 ml de solução salina tamponada O,OIM pH 7,2 (SST), e centrifugar novamente a 3000 rpm por 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante. Repetir este processo mais 2 vezes;
- Quantificar os parasitas em microscópio óptico e, caso a quantidade de promastigotas seja inferior a 20 a 30 parasitas por campo, recentrifugar e ressuspender a suspensão até se obter a concentração desejada. Caso a quantidade de parasitas seja superior, diluir a suspensão com SST.

### **PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS:**

- As lâminas são compostas de duas fileiras de seis orifícios (perfurações). Fixar o antígeno, colocando 10µL da suspensão de promastigotas, que logo em seguida é retirada, por aspiração, restando

somente uma fina película sobre cada orifício. Deixar as lâminas secarem em temperatura ambiente, e guardá-las em laminário à -20°C.

**Amostra de soro para a prova:**

- Ao redor de 0,5 mL de soro não hemolisado ou lipêmico, refrigerado ou congelado (conforme a distância do laboratório), juntamente com dados clínicos e epidemiológicos do animal, bem como a identificação do proprietário e requisitante, e dados necessários para comunicação;
- Se possível, o soro deve ser acondicionado em microtubo identificado, caso contrário poderá ser utilizado frasco de vidro tipo vacina ou penicilina.

**Diluição da amostra de soro a ser examinado:**

- Em uma microplaca, colocar 190µL de SST e 10µL do soro a ser testado no primeiro orifício (diluição 1:20) e homogeneizar;
- Distribuir 100µL de SST em outras cinco cavidades;
- A partir da primeira diluição, transferir 100µL para o orifício seguinte, homogeneizar e repetir esta operação até a quinta cavidade, desprezando os 100µL da cavidade final (1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640);
- Proceder da mesma forma para um soro sabidamente positivo (controle positivo) e outro sabidamente negativo (controle negativo).

**Reação de Imunofluorescência Indireta:**

- Fazer um protocolo, indicando a posição de cada soro a ser testado na lâmina, incluindo os controles positivo e negativo;
- Utilizar como diluição inicial 1:40;



- Na lâmina fixada com o antígeno, distribuir 10µL de cada diluição do soro nos orifícios de acordo com o protocolo;
- Incubar as lâminas à 37°C, em câmara úmida por 30 minutos;
- Lavar as lâminas com SST por 10 minutos em coplin, por duas vezes e em seguida secar em estufa;
- Proceder a diluição do conjugado espécie-específico, segundo o seu título, previamente estabelecido, em solução de azul de Evans a 20 mg%, a qual deve ser previamente diluída em SST na proporção 1:5;
- Distribuir 10 µL de conjugado para cada diluição, da lâmina;
- Incubar as lâminas a 37°C por 30 minutos em câmara úmida;
- Lavar as lâminas com SST por 10 minutos, por duas vezes e secar em estufa;
- Montar com glicerina tamponada pH 8,5 e lamínula 24mm x 60mm, e examinar em microscópio de imunofluorescência (aumento de 40x);
- Após a leitura dos controles, fazer a leitura do soro teste, considerando como título final a mais alta diluição do soro em que há fluorescência completa na borda de pelo menos 50% das promastigotas.

### **LIT (Liver Infusion Tryptose)**

1- Descongelar o soro fetal bovino;

2- Dissolver em 100 ml de água Mili-Q em Kitassato (de 500 ml):

<b>Reagentes</b>	<b>Quantidades</b>
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	2g
<b>NaCl</b>	1g
<b>KCl</b>	0,1g

3- Adicionar mais 44,5 ml de água Mili-Q, ao Kitassato;

- 4- Montagem do filtro: tampar a boca do Kitassato com a parte inferior do filtro. Colocar a membrana millipore sobre a camada interna do filtro respeitando a posição dela no suporte onde está guardada. Colocar a auréola de plástico sobre a membrana. Fechar o filtro com a parte superior e rosquear até encontrar resistência. Cobrir com papel alumínio de modo que nenhuma abertura fique exposta. Vedar com papel rosado e fita adesiva.
- 5- Autoclavar (121° C por 15 min) a suspensão de sais, duas pipetas de 10 ml e 8-12 tubos de LIT (30 x 2,6 cm);
- 6- Em um Erlenmeyer de 250 ml, dissolver 0,75 g de infusão de fígado em 100 mL de água Mili-Q aquecida. Esta água aquecida tem de estar a uma temperatura que o dorso da mão suporte;
- 7- Adicionar a esta suspensão:
 

<b>Dextrose</b>	0,5g
<b>Triptose</b>	1,25 g
- 8- Ajustar ao pH 7,4;
- 9- Quando a temperatura do Kitassato diminuir de modo que o dorso da mão, pode-se abrir, cuidadosamente, a parte superior do Kitassato, sem abrir a parte inferior. Deve-se acoplar a bomba de vácuo na extremidade lateral do Kitassato, de modo a filtrar o meio;
- 10- Ligar a bomba de vácuo, a uma pressão de 150-200mmHg;
- 11- Colocar a suspensão de infusão de fígado e carboidratos na parte superior do filtro, para serem filtrados.
- 12- Após a filtração da suspensão anterior, adicionar 5,5 ml de hemoglobina 2,2%;
- 13- Ao término da filtração, deve-se fechar a extremidade superior do filtro;
- 14- Colocar duas pipetas de 10 ml ou uma de 10 ml e uma de 20 ml, dois tubos de BHI (controle de esterilidade), soro fetal bovino, 8-12 tubos de LIT (30x2,6 cm), duas seringas de 5 ml e duas agulhas 30x7 mm, todos previamente autoclavados, dentro da câmara de fluxo laminar e deixar sob a ação da luz UV

por 15 minutos. Deve-se ainda submeter o Kitassato e um frasco de Gentamicina (Gentocin® - 20mg) a ação da luz UV, juntamente com os materiais mencionados acima.

15- Após estes 15 minutos, adicionar ao Kitassato:

<b>Soro fetal bovino</b>	<b>30 ml</b>
<b>Gentamicina (Gentocin® - 20mg)</b>	<b>1 ml</b>

16- Homogeneizar bem o meio.

17- Pipetar de 01-02 ml de LIT para o primeiro tubo BHI, 30 ml em cada tubo de LIT e, ao final, mais 01-02 ml para o segundo tubo BHI.

18 - Manter sob controle de esterilidade por 48 horas em estufa 37°C.

#### **NNN (McNeall, Novy & Nicolle)**

<b>Reagentes</b>	<b>50 ml</b>	<b>150 ml</b>
<b>Ágar Base (Bacto ágar)</b>	0,75 g	2,25 g
<b>NaCl</b>	0,33 g	0,99 g
<b>Água Milli-Q</b>	50 ml	150 ml

Diluir o sal e ágar base, em um Erlenmeyer, com Água Milli-Q. Tampar com “boneca” de algodão hidrófobo, papel laminado e papel rosado. Após diluído, deve-se autoclavar esta solução, os tubos de NNN, e duas a três pipetas, de vidro, graduadas de 10 ml, a 121°C por 15 minutos.

Após autoclavado, deve-se deixar a solução preparada, em estufa para não endurecer.

Acrescentar 10-15% de sangue ovino, desfibrinado. Este frasco deve ser homogeneizado desde o momento que o animal foi puncionado. A homogeneização do frasco se deve ao fato da necessidade de se esgotar os fatores de coagulação (desfibrinização).

<b>Sangue</b>	<b>50 ml</b>	<b>150ml</b>
10-15% Sangue desfibrinado	6,5 ml	20 ml

Colocar o frasco, as pipetas, a solução de sal e ágar base e, os tubos de NNN na câmara de fluxo laminar e ligar a luz UV por 15 minutos, para que ocorra esterilização na superfície do material citado.

Decorridos o tempo na UV, adicionar os 20 ml de sangue, com pipeta, para o erlenmeyer com o sal e ágar base, homogeneizar bem e proceder a distribuição do meio nos tubos de NNN. Deve-se adicionar 05 ml por tubo e deixá-los inclinados, com a abertura sob um pipeta de 1 ml, para que formem um bixel até o final do tubo, permitindo, assim, o perfeito crescimento das promastigotas em todo o tubo, não havendo desperdício de meio.

Controle de esterilidade: estufa de 37°C por 48 horas.

Após as 48 horas, embrulham-se os tubos viáveis em papel alumínio e papel rosado, guardando-os sob refrigeração até o momento da utilização.